

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA

E.A.P. DE MEDICINA VETERINARIA

**Frecuencia de *Neospora caninum* en bovinos lecheros
de 4 distritos del Valle del Mantaro (Junín)**

TESIS

Para optar el Título Profesional de Médico Veterinario

AUTOR

Silvia Jesús Granados Zúñiga

Lima – Perú

2012

DEDICATORIAS Y AGRADECIMIENTOS

A mis padres Jorge y Carmela por entender mi verdadera vocación y darme su apoyo en todo momento, están conmigo siempre.

A Zuly quien siempre me alentó a seguir adelante pese a las adversidades de la vida, sus palabras me dieron la fuerza suficiente para continuar y concretar no solo este trabajo sino muchos más.

A la Dra. Amanda Chávez mi guía en este proyecto, quien me orientó y encamino en el desarrollo de esta tesis; agradezco la confianza depositada en mí, siempre le estaré agradecida por sus consejos y su comprensión.

A mis amigos y compañeros del laboratorio de parasitología: Rosita, Cristina, Katty, Helen, Benji, Karen, Elizabeth; con quienes compartí gratos momentos, y quienes me brindaron su ayuda cuando la necesite, gracias amigos.

A Charo, quien me guió y apoyo a lo largo de la carrera con sus enseñanzas y consejos pero sobre todo porque me enseñó a amar esta maravillosa profesión.

Al Dr Arana por guiarme en la parte práctica de este estudio y al Dr Suarez quien me orientó y sugirió la presentación de este trabajo.

CONTENIDO

	Pág
DEDICATORIAS Y AGRADECIMIENTOS.....	i
CONTENIDO.....	ii
LISTA DE CUADROS.....	v
ABREVIATURAS.....	vi
RESUMEN.....	vii
ABSTRACT.....	viii
I. INTRODUCCION.....	1
II.REVISION BIBLIOGRAFICA.....	3
2.1. Generalidades.....	3
2.1.1. Etiología.....	3
2.1.2. Taxonomía.....	4
2.1.3. Características Morfológicas.....	4
2.1.4. Ciclo Biológico.....	6
2.2. Epidemiología.....	6
2.2.1. El Parásito.....	6
2.2.2. Hospederos.....	7
2.2.2.1. Hospederos Definitivos.....	7
2.2.2.2. Hospederos Intermediarios.....	8
2.2.3. Factores de riesgo.....	8
2.2.3.1. En Hospederos Definitivos.....	8
2.2.3.2. En Hospederos Intermediarios.....	9
2.2.3.2.1. Sistema de Manejo.....	9
2.2.3.2.2. Tamaño de la explotación.....	9
2.2.3.2.3. Edad de los animales.....	10
2.2.3.2.4. Forma de reposición de animales.....	10
2.2.3.2.5. Época del año.....	10
2.2.3.2.6. Pastoreo, forraje y agua.....	10

2.2.3.2.7. Estado inmune de la madre.....	11
2.2.3.2.8. Otras infecciones presentes.....	11
2.2.4. Neosporosis en el Perú.....	12
2.2.4.1. Estudios de <i>Neospora caninum</i> en Bovinos Lecheros y fetos Abortados.....	12
2.2.4.2. Estudios de <i>Neospora caninum</i> en Caninos.....	15
2.2.4.3. Estudios de <i>Neospora caninum</i> en Camélidos Sudamericanos.....	16
2.2.4.4. Estudios de <i>Neospora caninum</i> en Búfalos de Agua.....	17
2.2.5. Prevalencia.....	18
2.2.6. Importancia de la Neosporosis.....	23
2.2.6.1. Importancia económica.....	23
2.2.6.2. Importancia en Salud Pública.....	24
2.3. Patogenia.....	24
2.3.1. Transmisión de <i>Neospora caninum</i> en los perros.....	25
2.3.2. Transmisión de <i>Neospora caninum</i> en los bovinos.....	26
2.3.2.1. Transmisión Transplacentaria Vertical.....	26
2.3.2.1.1. Infección Transplacentaria Endógena.....	26
2.3.2.1.2. Infección Transplacentaria Exógena.....	27
2.3.2.2. Transmisión Transplacentaria Horizontal.....	27
2.3.2.3. Patogenia Placentaria.....	28
2.3.2.4. Patogenia Fetal.....	29
2.4. Inmunidad.....	29
2.4.1. Inmunidad durante la gestación.....	30
2.4.2. Inmunidad, gestación e infección por <i>Neospora caninum</i>	31
2.4.3. Respuesta inmune humoral.....	32
2.4.4. Respuesta inmune celular.....	33
2.5. Signos Clínicos.....	34
2.5.1. Signos clínicos en Bovinos.....	34
2.5.2. Signos clínicos en Caninos.....	35

2.5.3. Signos clínicos en Ovinos y Caprinos.....	36
2.5.4. Signos clínicos en otras especies.....	37
2.6. Lesiones en Caninos y Bovinos.....	37
2.7. Diagnostico.....	38
2.7.1. Diagnostico Serológico.....	39
2.7.1.1. Inmunofluorescencia Indirecta.....	39
2.7.1.2. Aglutinación Directa.....	40
2.7.1.3. Inmunoblot.....	40
2.7.1.4. Prueba rápida inmunocromatográfica.....	41
2.7.1.5. Inmunoabsorción ligada a enzimas.....	41
2.7.2. Diagnostico no Serológico.....	44
2.7.2.1. Aislamiento del parásito.....	44
2.7.2.2. Examen histopatológico.....	44
2.7.2.3. Inmunohistoquímica.....	45
2.7.2.4. Reacción en cadena de la polimerasa.....	46
2.8. Tratamiento.....	46
2.9. Control y Prevención.....	47
III. MATERIALES Y METODOS.....	51
3.1. Lugar de estudio.....	51
3.1.1. Ubicación.....	51
3.1.2. Animales.....	51
3.1.3. Clima.....	51
3.1.4. Pasturas.....	52
3.2. Materiales.....	52
3.3. Tamaño muestral.....	52
3.4. Recolección de muestras.....	54
3.5. Procesamiento de las muestras.....	54
3.6. Desarrollo de la técnica de ELISA.....	55
3.7. Análisis de los datos.....	56
3.7.1. Prevalencia.....	56

3.7.2. Intervalo de Confianza.....	56
IV. RESULTADOS	57
V. DISCUSION.....	59
VI. CONCLUSIONES.....	63
VII. RECOMENDACIONES.....	64
VIII. ANEXOS.....	65
IX. BIBLIOGRAFIA.....	70

LISTA DE CUADROS

	Pag.
Cuadro 1. Seroprevalencias de <i>N. caninum</i> en bovinos del Perú.	14
Cuadro 2. Seroprevalencias de <i>N. caninum</i> en caninos del Perú.	15
Cuadro 3. Seroprevalencias de <i>N. caninum</i> en Camélidos Sudamericanos del Perú.	17
Cuadro 4. Seroprevalencia de <i>Neospora caninum</i> en Bovinos lecheros a nivel mundial.	19
Cuadro 5. Seroprevalencia de <i>Neospora caninum</i> en Bovinos de carne a nivel mundial.	20
Cuadro 6. Seroprevalencia de <i>Neospora caninum</i> en caninos a nivel Mundial.	21
Cuadro 7. Seroprevalencia de <i>Neospora caninum</i> en otras especies a nivel mundial.	22
Cuadro 8. Pruebas de diagnóstico serológico comercialmente disponibles.	43
Cuadro 9. Total de Establos muestreados por distritos según tipo de crianza. Provincia Concepción – Junín. 2010	54
Cuadro 10. Frecuencia relativa porcentual de bovinos lecheros positivos a Neospora en los distritos de Matahuasi, Concepcion , 9 de julio y Santa Rosa. 2010	58
Cuadro 11. Frecuencia relativa porcentual de bovinos positivos a Neospora según tipo de crianza en los distritos de Matahuasi, Concepción , 9 de julio y Santa Rosa. 2010	58

ABREVIATURAS

ELISA: Inmunoabsorción ligada a enzimas.

IFI: Inmunofluorescencia indirecta.

Ig: Inmunoglobulinas.

IHC: Inmunohistoquímica.

IL: Interleuquina.

IFN: Interferon.

VDVB: Virus de la diarrea viral bovina.

CSA: CAMELIDO SUDAMERICANO.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.

IB: Inmunoblot.

ICT: Prueba rápida inmunocromatográfica.

DAT: Aglutinación directa.

SNC: Sistema Nervioso Central

NAT: Nucleic acid testing.

CD: Grupo de diferenciación.

Th: Linfocito T de ayuda.

NK: Natural killer

CMH: Complejo mayor de histocompatibilidad.

IVITA: Instituto Veterinario de Investigaciones Tropicales y de Altura.

RESUMEN

N. caninum es el agente causante de grandes pérdidas económicas en la ganadería debido a que produce aborto y mortalidad neonatal en vacas. El objetivo del presente estudio fue determinar la frecuencia de *N. caninum* en vacas lecheras de la cuenca izquierda del Valle del Mantaro. Se evaluaron 182 sueros de bovinos hembras provenientes de 15 establos lecheros de los distritos de Matahuasi, Concepción, 9 de Julio y Santa Rosa todos de la provincia de Concepción (Junín), encontrándose una frecuencia de anticuerpos contra *N. caninum* de 46.7 ± 7.24 % (85/182). El distrito con máxima frecuencia fue Matahuasi con 68.75% y el distrito con menos frecuencia el de Santa Rosa con 17.8%. Excepto un establo del distrito de Santa Rosa, todos los demás presentaron al menos un animal positivo a *N. caninum*. Estos resultados confirman la presencia de una frecuencia relativamente alta a *N. caninum*.

Palabras claves: *N. caninum*, vacas, frecuencia, anticuerpos, establos lecheros

SUMMARY

N. caninum is the causative agent of major economic losses in livestock due to causes abortion and neonatal mortality in cattle. The aim of this study was to determine the frequency of *N. caninum* in dairy cows left the basin of the Mantaro Valley. We evaluated 182 female cattle sera from 15 dairy farms in the districts of Matahuasi, Concepción, July 9th and Santa Rosa all of the province of Concepción (Junin), being a frequency of antibodies against *N. caninum* of $46.7 \pm 7.24\%$ (85/182). It was observed that the district maximum frequency was 68.75% Matahuasi with the district and less frequently the Santa Rosa with 17.8%. Except for a stable district of Santa Rosa, everyone else had at least one positive animal *N. caninum*. These results confirm the presence of a relatively high frequency *N. caninum*.

Key words: *Neospora caninum*, cattle, frequency, antibodies, dairy farms.

I. INTRODUCCION

El aborto bovino es un factor limitante del desarrollo ganadero en todos los países del mundo, puede presentarse en forma esporádica o endémica y epidémica; pudiendo ser de origen infeccioso y no infeccioso por lo que establecer el agente causal resulta difícil. Dentro de los agentes infecciosos que puedan afectar las membranas fetales y/o fetos se encuentran: *Brucella*, *Leptospirosis*, *Diarrea Viral Bovina* (DVB), *Aspergillus* sp, *Neospora caninum* entre otros y pueden ocasionar en el embrión o feto un conjunto de fetopatías dependiendo del periodo de la gestación y de la virulencia del agente infeccioso (Rivera, 2001).

En el Perú entre los agentes infecciosos abortígenos de mayor importancia en ganado lechero de crianza intensiva o semi intensiva figuran, la *DVB*, *N. caninum*, *Brucella abortus*, *Leptospira* y en menor grado el *Herpes bovino* tipo 1 (IBR). La responsabilidad de la *Brucella abortus* en la presentación de abortos en las principales cuencas lecheras, es cada vez menor debido a su baja prevalencia (<1%); mientras que la *DVB* y *N. caninum* son al parecer las principales causantes de los problemas reproductivos en el ganado lechero (Rivera *et al.*, 2000).

La neosporosis, enfermedad producida por *Neospora caninum*, es causa de abortos en vacas en todos los continentes y por lo tanto genera pérdidas económicas directas como también costos indirectos asociados al diagnostico veterinario, repetición de la inseminación, aumento tiempo de lactancia, pérdidas de producción láctea y los

costos de reemplazo en los casos de eliminación de las vacas (Barr *et al.*, 1997; Anderson *et al.*, 2000; Dubey, 2003a).

En el país se han encontrado prevalencias de anticuerpo contra *N. caninum* en bovinos lecheros; 57% en Arequipa (Anderson, 1999); 42.9% en Cajamarca (Cabrera *et al.*, 2000); 29.6% en el Valle de Lima (Silva *et al.*, 2002); 40.4% en Amazonas (Quevedo *et al.*, 2003) y 18.1% en Puno (Atocsa, 2005). Sin embargo, a pesar de estos resultados, se hace necesario continuar aportando mayor información epidemiológica relacionada a la neosporosis en nuestro país.

El objetivo del estudio fue determinar la frecuencia de anticuerpos contra *Neospora caninum* en bovinos lecheros de la cuenca izquierda del Valle del Mantaro (Junín).

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. Generalidades.

2.1.1. Etiología

Neospora caninum es un protozoo que parasita a los animales en todo el mundo; la neosporosis produce alteraciones neuromusculares en los perros y abortos o mortalidad neonatal en los bovinos (Dubey, 2003b).

Los primeros indicios de la neosporosis datan de 1984 cuando se describe una enfermedad neurológica en perros con lesiones que mostraban una similitud con el *Toxoplasma gondii*, sin embargo los animales afectados no presentaban anticuerpos contra este parásito (Bjerkas *et al.*, 1984).

Recién en 1988, en los Estados Unidos, Dubey *et al.*, (1988) aislaron en 10 perros con alteraciones neurológicas, un parásito similar al *Toxoplasma gondii*, al cual mediante exámenes serológicos e inmunohistoquímicos lo identificaron y denominaron *Neospora caninum* (Dubey *et al.*, 1988).

El primer brote de abortos en vacunos se reportó en Nueva México (1989) desde entonces la neosporosis ha sido reportada en todo el mundo, afectando a diferentes especies de animales: rumiantes (Ortega *et al.*, 1997); equinos (Dubey y

Porterfield,1990); caninos, búfalos de agua y ciervos de cola blanca (Dubey, 2003a; Dubey *et al.*, 2006), además de reportarse anticuerpos contra *N. caninum* en camellos, zorros grises y rojos, coyotes y felinos (Dubey, 2003a), así como en camélidos sudamericanos (Chávez *et al.*, 2002).

2.1.2. Taxonomía

Neospora caninum pertenece al:

- Phylum: Apicomplexa
- Clase: Sporozoea
- Subclase: Coccidea
- Orden: Eucoccidia
- Suborden: Eimeriina
- Familia: Sarcocystiade
- Género: Neospora

En un inicio se lo relacionó con tres especies tanto de importancia veterinaria como de salud pública: *Toxoplasma gondii*, *Hammondia hammondi* y *Hammondia heydorni*. Aunque en los análisis de secuencia de la subunidad menor del ARN ribosomal se observó una gran similitud entre *N. caninum* y *T. gondii* (Ellis *et al.*, 1994; Holmdahl *et al.*, 1994).

En otras investigaciones mediante RAPD-PCR, se demostró diferencias significativas entre el genoma de *Neospora*, *T. gondii* y *Sarcocystis* (Guo y Jonson, 1995). Otros estudios señalan que el *N. caninum* estaría filogenéticamente más próximo a *H. heydorni* (Ellis *et al.*, 1999; Heydorn y Mehlhorn, 2002) pero ha quedado demostrado diferencias biológicas, inmunológicas, morfológicas y moleculares entre estos dos parásitos (Dubey *et al.*, 2002).

2.1.3. Características Morfológicas

El *Neospora caninum* presenta tres estadios infectivos:

✍ **Taquizoítos:** Miden aproximadamente entre 3 y 7 μm de longitud y 1 – 5 μm de ancho, son de forma ovoide, semilunar o globular dependiendo de la fase de división en que se encuentren. (Dubey *et al.*, 2002). Presentan una película formada por un plasmalema y una membrana interna, un complejo apical constituido por: 22 microtúbulos, dos anillos apicales, un conoide y un anillo polar; organelas secretoras compuestas por: micronemas, 8-24 roptrias y gránulos densos; mitocondria, núcleo, nucléolo, un Complejo de Golgi, ribosomas, polisomas, gránulos de amilopectina, cuerpos lipídicos, vesículas, retículo endoplásmico liso y rugoso y un poro posterior (Speer y Dubey, 1989; Lindsay *et al.*, 1999). Los taquizoitos son de división rápida dentro de las células; en los animales infectados se encuentran en macrófagos, polimorfonucleares, células neurales (axones, células de Schwann, neuronas, células de la retina y astrocitos), fibroblastos, células endoteliales, miocitos, células epiteliales tubulares de los riñones y hepatocitos. Pueden encontrarse alojados en tejidos tanto del hospedero definitivo como del intermediario (Dubey y Lindsay, 1996; Dubey *et al.*, 2006).

✍ **Quiste Tisular con Bradizoíto:** Con frecuencia son redondos a ovales, de más de 107 μm de largo y se encuentran sólo en el tejido nervioso (cerebro, médula espinal y retina). La pared del quiste es lisa y mide más de 4 μm de espesor dependiendo del tiempo de infección. En muchos quistes tisulares la pared es de 1 a 2 μm de espesor. La pared del quiste está formada por dos membranas, la externa, una única membrana electrodensa y la interna de mayor grosor, granular y con estructuras tubulares no hay septos y no existe pared quística secundaria. Los bradizoitos contenidos en los quistes se replican lentamente, son delgados (7.3 X 1.5 μm) y contienen algunas organelas similares a las de los taquizoítos. La localización del núcleo en el bradizoito es terminal a subterminal. Pueden encontrarse alojados en los tejidos del hospedero definitivo e intermediario (Speer y Dubey, 1989; Bjerkas y Dubey, 1991; Dubey y Lindsay, 1996; Dubey *et al.*, 2006).

✍ **Ooquiste:** Tiene una medida aproximada de 10 a 12 μm , de forma esférica y con una pared delgada entre 0.6 a 0.8 μm de espesor. Los ooquistes son eliminados no esporulados con las heces del hospedero definitivo. Los ooquistes esporulan

luego de 24 a 72 horas dependiendo del medio ambiente, presentando dos esporoquistes de forma elipsoidal y miden 8.4 X 6.1 μm aproximadamente. Cada uno de los esporoquistes contiene cuatro esporozoitos de forma elongada y miden 6.5 X 2 μm . Los ooquistes de *N. caninum* morfológicamente son similares a los ooquistes de *Toxoplasma gondii* y *Hammondia hammondi*, en heces de gato y de *Hammondia heydorni* en heces de perro (Mc Allister *et al.*, 1998; Dubey *et al.*, 2002).

2.1.4. Ciclo Biológico

Hasta 1998 no se conocía con certeza su ciclo biológico, pero estudios experimentales realizados ese año por Mc Allister *et al.*, (1998) señalaron al perro como el hospedero definitivo; éste consume tejidos de animales infectados con *N. caninum*, desarrollando a nivel intestinal la fase sexual del parásito, eliminando los ooquistes al medio ambiente a través de las heces. Los ooquistes esporulan en uno a tres días, tornándose infectivos y consumidos con los alimentos o el agua por los bovinos, ovinos, caprinos entre otros, quienes actúan como hospederos intermediarios. En éstos se desarrolla la fase asexual del parásito, cuando el ooquiste llega al tracto gastrointestinal liberan los esporozoitos, los que ingresan en las células entéricas transformándose en taquizoitos (replicación rápida) diseminándose y localizándose en macrófagos, células nerviosas, hepáticas, miocitos, fibroblastos, células epiteliales de los túbulos renales y también se pueden observar en placenta infectando al feto; posteriormente se forman los bradizoitos (replicación lenta) contenidos en quistes tisulares cuya localización principal es el tejido nervioso, frecuentemente encontrados en infecciones de curso crónico; estos al ser ingeridos por el hospedero definitivo se cierra el ciclo al dar inicio a la formación de los ooquistes (Mc Allister *et al.*, 1998; Dubey, 1999).

2.2. Epidemiología.

2.2.1 El Parásito

Dentro de los factores dependientes del parásito que pueden influir en el desarrollo de la infección tenemos al aislado de *Neospora caninum*, el cual se mantiene en cultivo celular; la dosis infectante, el estadio parasitario y la presencia de infecciones

concurrentes (Dubey, 2003b). Los aislamientos realizados de diferentes hospederos son genéticamente similares, pero se sabe poco acerca de la variación entre cepas con respecto a la patogenicidad, observando que algunas cepas de *Neospora caninum* son más patógenas para ratones, que otras (Dubey *et al.*, 2007).

El primer reporte de *N. caninum* se dio en nuevo México en un ganado que presentaba abortos. Inicialmente se diagnosticó como *Toxoplasma gondii*, pero los quistes de éste no son causantes de abortos en ganado vacuno, por lo que se estableció a *N. caninum* como causante de este problema reproductivo (Dubey y Lindsay, 1996). Desde entonces la neosporosis está considerada como una de las enfermedades más importantes por causar pérdidas reproductivas sobre todo en el ganado vacuno (Ortega-Mora *et al.*, 2001).

La enfermedad está ampliamente distribuida en diferentes partes del mundo como: Europa, África, Australia, Nueva Zelanda y América (Dubey, 1999). Aunque la neosporosis fue identificada hace aproximadamente dos décadas, los avances han sido satisfactorios pero todavía queda por establecer aspectos como la frecuencia natural de transmisión post natal en bovinos (Mc Allister *et al.*, 2000).

Estudios realizados demuestran que la neosporosis afecta tanto a razas lecheras como de carne resultando expuestas hasta el 100 % de los hatos (Dubey *et al.*, 1996; Dubey *et al.*, 1997; Quintanilla *et al.*, 1999). Sin embargo, son escasos los informes de neosporosis en ganado bovino de carne (Waldner *et al.*, 1999).

2.2.2. Hospederos

2.2.2.1. Hospederos Definitivos

La primera especie animal en la cual esta enfermedad fue reconocida en 1984 fue el perro; se reportó por primera vez, la presencia de un parásito de características similares al *Toxoplasma gondii*, el cual era causante de problemas de tipo neuromusculares en perros. (Bjerkas *et al.*, 1984). Posteriormente, en 1988 Dubey *et al.*, aislaron de 10 perros un parásito distinto al *T. gondii*, denominándolo *Neospora caninum*.

En 1998, Mc Allister *et al*, determinaron el ciclo biológico del *N. caninum*, y señalaron al perro como el hospedador definitivo. La transmisión en el perro es por ingestión de tejidos contaminados con bradizoitos provenientes de algún hospedero intermediario. Pero también el perro puede actuar como hospedero intermediario al consumir ooquistes en la comida o el agua (Dubey, 2003). La vía vertical está presente en esta especie, aunque hay estudios que evidencian que esta vía de transmisión es poco efectiva para mantener la infección en los perros (Cole *et al* 1995; Dubey, 2003).

En el 2004, Gondim *et al*, determinaron como otro hospedador definitivo al coyote; para lo cual experimentaron con cuatro coyotes criados en cautiverio y a los cuales se les dio como alimento tejido de terneros infectados con *neospora caninum* posteriormente se examinaron sus heces y se les tomo muestras de sangre, encontrándose títulos de anticuerpo de este parásito.

Todavía se encuentra en debate si los zorros y más aún los lobos que tienen una relación filogenética cercana con los perros puedan también ser hospederos definitivos de *N. caninum* (Dubey *et al.*, 2007).

2.2.2.2. Hospederos Intermediarios

El ciclo biológico involucra variados hospederos intermediarios, entre los que se incluyen bovinos, ovinos, caprinos, equinos, búfalos de agua y perros. Adicionalmente, existen diferentes estudios en los cuales se ha encontrado serología positiva a *Neospora* en animales salvajes, incluyendo el zorro rojo y gris, el zorro de Chiloé, el coyote y el león (Buxton *et al.*, 2002; Dubey, 2003), en animales marinos (Dubey *et al.*, 2003); como también en camélidos sudamericanos (Chávez *et al.*, 2004).

2.2.3. Factores de Riesgo

2.2.3.1. En Hospederos Definitivos

La presencia del perro en el hato es un factor de riesgo de seropositividad en el ganado por ser este el hospedero definitivo del *N. caninum*. Hay que tener en cuenta el número de perros en el hato, es frecuente que defequen sobre el alimento o agua del

ganado entonces la convivencia diaria de estas dos especies aumenta los riesgos de infección (Dubey *et al.*, 2007).

En otros países se ha determinado que el coyote y el zorro gris también son factores de riesgo en la transmisión horizontal de la infección existiendo una asociación entre la presentación de *N. caninum* en los hatos con problemas de aborto y la presencia de los cánidos (Barling *et al.*, 2000; Gondim *et al.*, 2004).

2.2.3.2. En Hospederos Intermediarios

2.2.3.2.1. Sistema de Manejo

Los estudios realizados demuestran que la infección por *Neospora caninum* es más frecuente en bovinos lecheros que de carne. Dos estudios epidemiológicos indican que la presencia de perros en los hatos es un factor de riesgo para la ocurrencia de abortos por *Neospora* en vacas y el riesgo aumenta cuando existen de tres a más perros. (Puray, 2005).

2.2.3.2.2. Tamaño de la Explotación

Existen datos insuficientes que relacionan la presencia de la infección y el tamaño de la explotación pero se cree que la neosporosis afecta a bovinos lecheros de explotaciones de mediano y gran tamaño (Ortega-Mora *et al.*, 2001).

En un estudio realizado en Alemania, grandes rebaños tenían un mayor riesgo, siendo los de leche los de mayor positividad. Las explicaciones posibles son que al aumentar el tamaño del hato hay una mayor probabilidad de adquirir *N. caninum*, por ejemplo al comprar vaquillas de reposición (Dubey *et al.*, 2007).

2.2.3.2.3. Edad de los Animales

Al parecer la mayoría de los abortos endémicos y esporádicos en vacas por *Neospora caninum* son por una reactivación de una infección crónica, donde las vacas

seropositivas tienen dos a tres veces más riesgo de aborto que las seronegativas. (Jara, 2010). Existe una mayor predisposición en novillas congénitamente infectadas de abortar en su primera preñez de aquellas seronegativas; *N. caninum* es más evidente en novillas que en vacas y decrece con el número de partos, al parecer la inmunidad maternal se va incrementando con la edad (Anderson *et al.* 1997).

2.2.3.2.4. Forma de reposición de animales

No hay estudios de asociación entre la infección y la adquisición o movimientos de los animales en las explotaciones, pero si se han reportado casos específicos de introducción de *N. caninum* en rebaños tanto de leche como de carne con animales adquiridos sin diagnóstico previo (Puray, 2005).

2.2.3.2.5. Época del año

En 1997, Thurmond *et al.*, observaron un patrón estacional altamente significativo con respecto a la presentación de *N. caninum* en hatos de California; el más alto número de casos positivos se presentó durante el invierno que en California es templado y húmedo. Ese mismo año, Wouda *et al* señalaron que en los países bajos, los abortos ocurren con mayor frecuencia en verano. Hay varias explicaciones posibles para este fenómeno. Las bajas temperaturas y la humedad favorecen la esporulación y la supervivencia de los ooquistes; otra es el hecho de que bajas temperaturas y humedad favorecen el crecimiento de hongos, causando una inmunosupresión al ganado que pueden favorecer el recrudecimiento de *N. caninum* (Dubey *et al.*, 2007).

La presentación de abortos e infecciones postnatales se presentan en cualquier época del año pero se ha observado una mayor frecuencia en la época de otoño – invierno debido probablemente a factores inmunosupresores relacionados con la alimentación y el estrés (Ortega-Mora *et al.*, 2001).

2.2.3.2.6. Pastoreo, forraje y agua

Pastos, forrajes y agua de bebida contaminados con ooquistes son considerados como potenciales fuentes de infección postnatal del ganado. Alimentación de vaquillas

con forrajes de baja calidad o forrajes remanente durante el verano, puede ser un factor de riesgo para la presentación de *N. caninum* asociados a abortos en los países bajos. El efecto de la alimentación forrajera de calidad inferior puede suponer un impacto negativo por la presentación de hongos en el sistema inmunológico del ganado. El forraje remanente puede contener una mayor proporción de contaminantes como heces de los perros que son los hospederos definitivos del parásito (Dubey *et al.*, 2007).

2.2.3.2.7. Estado Inmune de la madre

La infección con *N. caninum* en grupos de vacas gestantes es fácilmente adquirida debido a que la regulación inmune se encuentra suprimida durante esta etapa. Se asume que la infección fetal es adquirida posterior a la parasitemia maternal. Sin embargo se menciona, que más infecciones ocurren en vacas que presentaban infección persistente, que las que entraban en gestación (Rodríguez, 2009).

Se ha comprobado que las vacas infectadas persistentemente desarrollan una inmunidad natural protectora contra una segunda exposición a *Neospora* (Moore *et al.*, 2005). La principal respuesta inmune protectora contra infecciones de parásitos intracelulares es la respuesta mediada por células asociada a linfocitos T helper tipo 1, los cuales estimulan la producción de interferón γ (IFN γ), interleuquina 12 (IL-12) e IL-2; pero en las vacas gestantes se produce un ambiente inmunológico particular, generándose una disminución en este tipo de respuesta inmune entre los 4 y 6 meses de gestación, lo cual favorecería la multiplicación del parásito y la transmisión vertical en este periodo (Anderson *et al.*, 2000; Moore *et al.*, 2005).

2.2.3.2.8. Otras infecciones presentes

Debemos considerar la existencia de infecciones concurrentes por otros patógenos, agentes inmunodepresores infecciosos y no infecciosos que pueden predisponer al aborto de fetos infectados por *N. caninum* (Barr *et al.*, 1991a). En fetos abortados por *N. caninum* se ha detectado en pocas ocasiones la presencia de otros agentes que pueden ser también causa de aborto, pero el virus de la *diarrea viral*

bovina (VDVB) está relacionado con *Neospora caninum* por la inmunosupresión que genera (Rodríguez, 2009).

2.2.4. Neosporosis en el Perú

En nuestro país, el primer reporte de *Neospora caninum* se presentó en Arequipa, encontrándose una prevalencia del 57% en el ganado lechero; luego se muestreó bovinos de la cuenca lechera de Lima, encontrándose una prevalencia del 27%. Estos resultados fueron establecidos mediante la prueba de Inmufluorescencia Indirecta (Andresen, 1999).

Desde esos años se han realizado diversos estudios del parásito en nuestro país, no solo en bovinos sino también en caninos, camélidos sudamericanos y recientemente en búfalos de agua empleándose para ello pruebas serológicas, inmunohistoquímicas y moleculares.

Para darnos una idea de las prevalencias encontradas en el Perú de *Neospora caninum*, presentamos un resumen de los estudios hechos en diversas zonas del país.

2.2.4.1. Estudios de *Neospora caninum* en Bovinos Lecheros y Fetos Abortados

Luego de los reportes publicados por Andresen (1999); en el 2000, Cabrera *et al.*, señala la presencia de *N. caninum* en el ganado lechero de Cajamarca, encontrándose anticuerpos contra el parásito, en el 43 y 10.5% de vacunos con y sin problemas reproductivos, respectivamente. Ese mismo año, Rivera *et al.*, reportan la presencia de quistes de *N. caninum* en 16 de 29 fetos abortados; por lo cual se confirmaba la presencia del *N. caninum* en nuestro país y se determinó como una causa importante de abortos en vacas lecheras del valle de Lima (Rivera *et al.*, 2000).

Silva en el 2002 hizo un estudio en el valle de Lima, abarcando la zona norte y sur; la primera comprendida entre los kilómetros 0 y 150 de la Carretera Panamericana Norte, hasta la provincia de Huacho y la segunda comprendida entre los kilómetros 0 y 150 de la Carretera Panamericana Sur, hasta la provincia de Cañete, reportando la

presencia de anticuerpos contra *N. caninum* en 29.6% de 304 muestras evaluadas, mediante la prueba de IFI.

Luego Linares en el mismo año, publicó los resultados de un estudio realizado en 8 fundos ganaderos en Cajamarca, en el cual confirma la transmisión vertical del parásito, mediante el análisis de sueros de vacas y sus crías. Para el diagnóstico se empleó la técnica de ELISA, encontrando una prevalencia a anticuerpos contra *N. caninum* en el 40.8 y 22.4% de las vacas y crías mestreadas, asimismo se determinó un porcentaje de transmisión vertical de 54.8%.

En el 2003, Quevedo *et al*, publicaron los resultados de un estudio realizado en el ganado lechero criado al pastoreo en la provincia de Chachapoyas, Amazonas encontrando una prevalencia de anticuerpos contra *N. caninum* en 40.41%. Ese mismo año, Ecurra realiza estudios en vacunos de crianza extensiva, de la Campiña de Baños del Inca en Cajamarca, determinando una prevalencia de 45.9% a *N. caninum*.

Para el 2004, se reporta en 1.5% la prevalencia de *N. caninum* en cebús y cruces, en Ucayali, estudio realizado por el IVITA – Pucallpa. También ese año se sabe de un estudio en los distritos de Campo Verde e Irazola en Ucayali, encontrándose elevadas prevalencias de 50.25 y 40.28%, respectivamente (Casas, E. comunicación personal).

Atocsa en el 2005 presentó los resultados de un estudio en ganado lechero criado al pastoreo, en la provincia de Melgar, en Puno. La prueba empleada fue IFI y los resultados indicaron la presencia de anticuerpos contra *N. caninum* en 18.1%.

En el 2006, Puray realizó estudios en bovinos lecheros de la empresa de Sociedad Agrícola de Interés Social (SAIS) Pachacutec, en el departamento de Junín; indicando la presencia de anticuerpos contra *N. caninum* en 12.8%. Mientras tanto ese año también, Torres, empleando la técnica de ELISA encontró una prevalencia de 39.08% en vacunos de la provincia de Chota, en el Departamento de Cajamarca.

Cuadro 1. Seroprevalencias de *N. caninum* encontradas en bovinos del Perú.

Lugar	N° de Muestras	Prevalencia (%)	Referencia
Arequipa	104	57	Andresen, 1999
Lima	173	27	Andresen, 1999
Cajamarca		42.9	Cabrera <i>et al.</i> , 2000
Lima*	29	55.2	Rivera <i>et al.</i> , 2000
Lima	304	29.6	Silva, 2002
Cajamarca	76	40.8	Linares, 2002
Cajamarca	76	22.4	Linares, 2002
Amazonas	265	40.4	Quevedo <i>et al.</i> , 2003
Cajamarca	74	45.95	Escurra, 2003
Ucayali	268	1.5	Rivera <i>et al.</i> , 2004
Ucayali		50.25	Casas, E. 2004
		40.28	Comunicación personal
Puno	419	18.1	Atocsa, 2005
Junín	347	12.8	Puray, 2006
Cajamarca	174	39.08	Torres, 2006

* estudios realizados en fetos abortados.

Fuente: Rodríguez, 2009

2.2.4.2. Estudios de *Neospora caninum* en caninos

La mayoría de estudios han sido realizados en ganado lechero por la importancia económica que tiene en nuestro país pero cuando se conoció que el perro era tanto hospedero definitivo e intermediario del *N. caninum* surgió el interés por investigar si los perros de los establos presentaban al parásito.

En el 2003, Del Campo hace un estudio en perros de establos lecheros del valle de Lima, usando IFI encontró un 32.7% de positividad al parásito. En el mismo año, Horna muestrea a caninos de los distrito de Molinopampa y Leymebamba, de la provincia de Chachapoyas, departamento de Amazonas; encontrando una prevalencia del $28.9\% \pm 7.5\%$.

Cornejo en el 2004 realiza un estudio en 124 caninos procedentes de 24 establos lecheros de la cuenca izquierda del valle del Mantaro, en el departamento de Junín. Usando la técnica IFI encontró una prevalencia del 19.4%.

En el 2007, Vega publica los resultados de un estudio realizado en perros pastores, procedentes de cinco zonas de producción de la empresa Rural Alianza, en el Departamento de Puno. La prevalencia hallada mediante la técnica de IFI fue 14.75%.

Cuadro 2. Seroprevalencias de *N. caninum* en caninos del Perú.

Lugar	N° de Muestras	Prevalencia (%±IC)	Referencia
Lima	104	32.7±9.0	Del Campo <i>et al.</i> , 2003
Amazonas	142	28.9±7.5	Horna <i>et al.</i> , 2003
Junín	124	19.4±7.0	Cornejo <i>et al.</i> , 2004
Puno	122	14.75±6.29	Vega, 2007

Fuente: Rodríguez, 2009

2.2.4.3. Estudios de *Neospora caninum* en Camélidos Sudamericanos del Perú (CSA)

En el 2002 se dio el primer reporte del parásito en Camélidos Sudamericanos por Chávez et al., realizando un muestreo en alpacas y llamas de la zona centro y sur del país, usando la técnica de IFI, determinaron la presencia de *N. caninum* con una prevalencia del 42.4% en alpacas y 18.4% en llamas.

Moya en el 2003 realizó un estudio en llamas hembras en la provincia de Melgar, departamento de Puno. La prevalencia encontrada fue de 16.7%. El mismo año, Rosadio et al., publican los resultados de un estudio realizado en la provincia de Canchis, en Cusco, para determinar agentes abortígenos en alpacas; la seroprevalencia hallada a *N. caninum*, fue de 2.5%.

En el 2004, Serrano hizo el primer estudio en fetos abortados de CSA. Se evaluaron 15 fetos abortados de llamas y alpacas entre los siete y ocho meses de gestación. Muestras de cerebro, fueron analizadas mediante las técnicas de histopatología, inmunohistoquímica y PCR. La infección por *N. caninum* fue confirmada en tres fetos (dos alpacas y una llama). Posteriormente, se publicaron los resultados de un estudio realizado en 50 fetos abortados de CSA, identificándose la presencia de *N. caninum* en el 38% (19/50) de las muestras.

En el 2006, Casas realizó estudios en llamas hembras, pertenecientes a la unidad de producción Agraria de Interés Social Pachacútec, Junín. Mediante IFI, se determinó la presencia de anticuerpos contra *N. caninum* en 2.9% (5/175) de las muestras evaluadas.

En el 2007, se publicaron los resultados de un estudio realizado en fetos abortados de CSA procedentes de la sierra central y sur del país. Las técnicas empleadas fueron histopatología, inmunohistoquímica y PCR. De 50 muestras analizadas, 13 resultaron positivas a histopatología y 14 resultaron positivas mediante las técnicas de IHQ y PCR (Serrano-Martínez et al., 2007).

Cuadro 3. Seroprevalencias de *N. caninum* en Camélidos Sudamericanos del Perú.

Especie	Lugar	N° de Muestras	Prevalencia (%±IC)	Referencia
Alpacas	Sierra central	92	42.4	Chávez <i>et al.</i> , 2002
	Cusco		2.53	Rosadio <i>et al.</i> , 2003
	Puno*	6	33.3	Serrano- Martínez <i>et al.</i> , 2004
Llamas	Sierra central	212	18.4	Chávez <i>et al.</i> , 2003
	Puno	275	16.7 ±4.4	Moya , 2003
	Puno*	9	11.1	Serrano-Martínez <i>et al.</i> , 2004
	Junín	175	2.9±2.5	Casas, 2006

* Estudios realizados en fetos abortados.

Fuente: Rodríguez, 2009

2.2.4.4. Estudios de *Neospora caninum* en Búfalos de Agua

En el 2010 Jara hizo el primer estudio de *N. caninum* en Búfalos de Agua en el distrito de Jenaro Herrera, Loreto, fueron evaluados 83 sueros de búfalos hembra mediante la técnica de ELISA, no encontrándose evidencia de anticuerpos contra este parásito.

2.2.5. Prevalencia

Las infecciones producidas por *Neospora caninum* han sido reportadas en muchos países en el mundo y en algunos han sido reconocidas como la causa más importante de aborto bovino e infecciones congénitas.

Los diversos estudios de prevalencia de anticuerpos contra *Neospora caninum* indican que está presente en todo el mundo, encontrándose en Australia, Nueva Zelanda, Europa, China, Japón, África y América, siendo notificado en muchas especies animales como bovinos, ovinos, búfalos de agua, equinos, caninos, camélidos, entre otros (Dubey et al, 2007).

La neosporosis bovina ha sido informada en África, América, Asia, Europa y Oceanía. Los valores de seroprevalencia obtenidos varían de acuerdo al país, región, técnica diagnóstica, punto de corte, tamaño de muestra seleccionado, características del muestreo, tipo de ganado, explotaciones con o sin antecedentes de sufrir pérdidas reproductivas siendo difícil su comparación (Moore, 2006).

Cuadro 4. Seroprevalencia de *Neospora caninum* en bovinos lecheros a nivel mundial

PAIS	N° DE ANIMALES	PREVALENCIA (%)	TECNICA DIAGNOSTICA ^a
ALEMANIA	388	4.1	IFI
	1,357	6.8	ELISA
	4,261	27.0	IFI
ARGENTINA	33	51.5	IFI
	1,048	16.6	IFI
BELGICA	711	12.2	IFI
BRASIL	447	14.0	IFI
	444	30.4	IFI
	100	46.0	ELISA
	23	21.7	IFI
	172	34.8	ELISA
	1,549	17.8	IFI
	75	22.7	IFI
	521	15.9	IFI
CANADA	3,412	7.0	ELISA
	3,702	12.1	ELISA
	2,037	21.9	ELISA
CHILE	198	15.7	IFI
	173	30.2	IFI
DINAMARCA	1,561	2	ELISA/IFI
ESPAÑA	889	30.6	ELISA
	1,121	36.8	ELISA
	1,331	26.8	ELISA
EE.UU.	285	40.4	ELISA
	254	60.6	ELISA
	1,029	28.0	IFI
FRANCIA	575	26.0	ELISA
	2,141	17.0	ELISA
HOLANDA	2,430	39.4	ELISA
	6,910	9.9	ELISA
ITALIA	5,912	24.4	IFI
JAPON	145	20.0	IFI
	2,420	5.7	IFI
MEXICO	187	59.0	ELISA
	1,003	56.0	ELISA
NUEVA ZELANDA	800	7.6	ELISA
	1,199	33.6	IFI
PARAGUAY	297	35.7	ELISA
REINO UNIDO	4,295	17.1	ELISA
SUECIA	70	63.0	ELISA
	780	2.0	ELISA
URUGUAY	155	61.3	IFI

^a IFI: Inmunofluorescencia indirecta

Fuente: Dubey et al., 2007

Cuadro 5. Seroprevalencia de *Neospora caninum* en bovinos de carne a nivel mundial

PAÍS	Nº DE ANIMALES	PREVALENCIA	TÉCNICA DIAGNOSTICA ^a
ALEMANIA	2.022	4,1	ELISA
ANDORRA	1.758	7,4	ELISA
ARGENTINA	400 290	4.7 20.3	IFI IFI
AUSTRALIA	1.673	14.9	IFI
BÉLGICA	93	14	IFI
BRASIL	456 241 505 600	29.6 26.1 20.0 16.8	IFI ELISA ELISA IFI
CANADÁ	1,806 1,425 2,484	9.0 9.1 5.2	ELISA ELISA ELISA
ESPAÑA	1,712 2,407	17.9 15.8	ELISA ELISA
EE.UU.	2,585 208	23.0 79.0	ELISA ELISA
FRANCIA	219	4,1	ELISA
ITALIA	385	6	ELISA
JAPÓN	65	24,4	IFI
NUEVA ZELANDA	499	2,8	ELISA
PARAGUAY	582	26,6	ELISA
URUGUAY	4,444	13,9	ELISA

^a **IFI:** Inmunofluorescencia indirecta

Fuente: Dubey et al., 2007

En el mundo se han reportado prevalencias de anticuerpos en el 37.8% de perros en Argentina (Basso et al, 2001), 22% en Nueva Zelanda (Reichel et al, 1998), 10% en Turquía (Coskun et al, 2000), 6.7% y 10% en Brasil (Mineo et al, 2001; Gennari et al, 2002), 12% en perros urbanos y 26% en perros rurales de Chile, 4% en Alemania (Klein y Muller, 2001). (Cuadro 6).

La neosporosis también ha sido reportada en cabras, ovejas, búfalos de agua, camélidos sudamericanos, cerdos, gatos, equinos, caninos silvestres entre otros. (Cuadro 7).

Cuadro 6. Seroprevalencia de *Neospora caninum* en caninos a nivel mundial.

PAÍS	Nº DE ANIMALES	PREVALENCIA	TÉCNICA DIAGNOSTICA ^a
ALEMANIA	200	13	IFI
ARGENTINA	160	26.2	IFI
	125	48.0	IFI
	97	47.4	IFI
BRASIL	415		IFI
	345	12.0	IFI
	300	27.2	IFI
	92	10.7	IFI
	611	21.7	NAT
	295	25.0	IFI
CHILE	81	25.09	IFI
	120	12.5	IFI
ESPAÑA	139	12,2	IFI
EE.UU.	229	2.0	IFI
	1,077	7.0	IFI
ITALIA	1.058	6,4	IFI
MÉXICO	27	5.0	ELISA
	30	20.0	ELISA
NUEVA ZELANDA	150	76.0	IFI
	161	97.05	IFI
REINO UNIDO	104	5.8	IFI
	163	16.6	IFI
SUECIA	398	0,5	ELISA
URUGUAY	414	20	IFI

^a **IFI:** Inmunofluorescencia indirecta **NAT:** Test de Aglutinación Neospora

Fuente: Dubey et al., 2007

Cuadro 7. Seroprevalencia de *Neospora caninum* en otras especies a nivel mundial

HOSPEDERO	PAÍS	N° DE ANIMALES	PREVALENCIA (%)	TÉCNICA ^a
GATO	BRASIL	502	11.9	NAT
	BRASIL	400	24.5	IFI
	ITALIA	282	31.9	NAT
CAMELLO	EGIPTO	161	3.7	NAT
	IRAN	120	5.8	IFI
CERDO	ALEMANIA	2,041	3.3	ELISA
	REINO UNIDO	454	0	IFI
OVEJA	BRASIL	62	3.2	ELISA
	BRASIL	305	9.5	IFI
	REINO UNIDO	600	0.45	IFI
	SUIZA	117	10.3	IFI
CABRA	COSTA RICA	81	6.1	IFI
	BRASIL	394	6.4	IFI
LLAMA	PERU	81	1.2	IB
	PERU	73	32.9	IFI
	ALEMANIA	20	0	IB
ALPACA	PERU	657	2.6	IB
	PERU	78	35.9	IFI
	ALEMANIA	12	0	IB
VICUÑA	PERU	114	0	IB
BÚFALO DE AGUA	BRASIL	222	53	NAT
	BRASIL	196	70.9	IFI
	BRASIL	411	56	IFI
CABALLO	ARGENTINA	76	0	NAT
	BRASIL	101	0	NAT
	BRASIL	1,106	10.3	IFI
	EE.UU.	1,917	30.4	ELISA
COYOTE	CANADÁ	183	27.0	IFI
	EE.UU.	52	10.0	IFI
ZORRO	ALEMANIA	122	2.5	IB
	CANADÁ	270	34.8	NAT
	REINO UNIDO	546	0.9	IFI

^a **IFI:** Inmunofluorescencia indirecta. **NAT:** Test de Aglutinación Neospora. **IB:** Inmunoblott

Fuente: Dubey et al., 2007

2.2.6. Importancia de la Neosporosis

2.2.6.1. Importancia Económica

En California y Holanda, el 20% de los abortos bovinos son causados por *N. caninum*; en Bélgica y el Reino Unido alrededor del 12.5%. En Inglaterra se considera que se producen 6,000 abortos anuales debido a *N. caninum*, asignándole una pérdida de 800 dólares por cada aborto, se pierde aproximadamente 4,8 millones de dólares. En California se calculan pérdidas de 35 millones de dólares al año. En Nueva Zelanda y Australia, donde la infección es responsable de aproximadamente el 25% de los abortos diagnosticados se considera la causa más importante de pérdidas económicas con un gasto de 100 millones de dólares australianos anuales. En Canadá se estima que en una explotación de 50 animales, las pérdidas pueden llegar a ser de 2,305 dólares canadienses por año. En Argentina se estima que se pierde 80 millones de dólares por año (Moore *et al.*, 2005).

Por otra parte, se deben considerar los costos indirectos asociados al aborto tales como infertilidad, repetición de celo, asistencia veterinaria, gastos de diagnóstico, aumento del tiempo de lactancia, reposición, posibles pérdidas de producción de leche y compra de ganado en caso de sacrificio (Dubey, 1999).

La infección por *N. caninum* también podría afectar a la producción láctea; en un estudio en una explotación en Florida, la neosporosis causó el 3-4% de disminución en la producción láctea ocasionando pérdidas de 128 dólares por vaca en lactación. En un estudio realizado en California se concluyó que vacas seropositivas a *N. caninum* producían 1.3 Kg/día/vaca menos de leche que las vacas seronegativas (Dubey, 1999; Moore *et al.*, 2005).

En el sector cárnico, las pérdidas económicas debidas a *N. caninum* son menos conocidas debido a la dificultad de cuantificación, sin embargo se ha observado una asociación negativa entre la ganancia de peso y la presencia de anticuerpos anti *N. caninum* con pérdidas de 15.6 dólares por vaca (Moore *et al.*, 2005).

2.2.6.2. Importancia en Salud Pública

Debido a que dos monos Rhesus (*Macaca mulatta*) fueron infectados experimentalmente con *N. caninum*, existe la preocupación sobre el potencial zoonótico de este parásito. Actualmente no hay evidencia de que haya infectado a humanos (Dubey *et al.*, 2007).

En Dinamarca se hicieron los primeros estudios en humanos. En 1999, se muestrearon mujeres entre 19 y 41 años que presentaron abortos o muerte fetal en el primer trimestre de gestación para ellos se utilizó IFI, Western blot y ELISA, los resultados fueron negativos. (Petersen *et al.*, 1999). En el mismo año en California se estudiaron 1029 sueros humanos, 50 (4.9%) presentaron títulos de 1:100 con IFI para *N. caninum*; los resultados de estos estudios sugieren la exposición humana a *N. caninum* pero se necesitan más estudios para determinar el grado y la importancia de la exposición (Tranas *et al.*, 1999).

En Inglaterra entre 1995 al 2000 se recolectaron 3232 muestras de suero de personas entre 20 y 70 años, de las cuales 1889 (58.45%) eran de mujeres, se emplearon para el estudio las técnicas de IFI y de ELISA no evidenciándose en ninguna muestra una exposición a *N. caninum*, estos resultados sugieren que la infección en humanos es poco probable pero por las prevalencias variables en el ganado en todo el mundo y la incidencia de la excreción de ooquistes junto con las heces del perro existe la necesidad de mantenerse alerta ante una posible transmisión al hombre (McCann *et al.*, 2008).

2.3. Patogenia

Experimentalmente se ha logrado transmitir por diferentes vías: intramuscular, subcutánea, intravenosa, intraperitoneal, calostrál y oral (Dubey y Lindsay 1996), Sin embargo, la vía transplacentaria es el principal modo de contagio (Barr *et al.*, 1993; Buxton *et al.*, 1997; Ortega- Mora *et al.*, 2001).

2.3.1. Transmisión de *Neospora Caninum* en los perros

Como los perros se infectan en la naturaleza no se entiende aún la transmisión de *N. caninum* en estos animales. La transmisión vertical fue reconocida por primera vez en perros por Bjerkas en 1984; en tres camadas sucesivas de una perra de Noruega. En un estudio retrospectivo, la neosporosis más grave se identificó en 4 pastores alemanes en el año de 1957 en Ohio y no había evidencia de que una perra infectada transmitiera congénitamente la enfermedad a su descendencia.

Experimentalmente se ha demostrado la transmisión transplacentaria en perros. En la mayoría de los casos, los cachorros con neosporosis no presentan signos clínicos evidentes hasta las 5 a 7 semanas de nacidos. Estos datos sugieren que *N. caninum* se transmite desde la presa hasta los recién nacidos al terminar la etapa de la gestación o tras el nacimiento a través de la leche. De acuerdo con Barber y Trees, la transmisión vertical de la neosporosis en perros es muy variable y no es probable que persista en ausencia de la infección horizontal.

En un estudio, solo el 3% (4 de 118) de los cachorros de 17 hembras seropositivas eran seropositivos. En general, el 80% de los cachorros nacidos de hembras seropositivas fueron consideradas que no estaban infectadas con *N. caninum*; estos resultados están respaldados por un estudio reciente en el que se encontró que 3 de 11 cachorros de la primera camada y sólo 1 de 7 de la segunda camada presentaban neosporosis. Estos resultados obtenidos con los perros son radicalmente diferentes de los obtenidos con el ganado. Los datos de prevalencia indican que la mayoría de los perros se infectan después de nacer. Prevalencias más altas se han documentado en perros mayores que en jóvenes.

En un reporte, el 51% de 300 perros de caza alimentados con canales bovinos, presentaron anticuerpos de *N. caninum*. Mientras que el consumo de fetos bovinos abortados no parece ser una fuente de infección; el consumo de membranas fetales sí lo puede ser. El parásito ha sido encontrado de forma natural en placentas y los perros alimentados con estas placentas de vacas seropositivas pueden arrojar ooquistes de *N.*

caninum. Que los perros pueden ser infectados por la ingestión de tejidos infectados ha sido ampliamente demostrado pero si se pueden infectar por la ingestión de ooquistes es aún desconocido (Dubey, 2007).

2.3.2. Transmisión de *Neospora Caninum* en los bovinos

La transmisión de *N. caninum* es posible mediante la transmisión vertical en útero, lo cual corresponde a modos de infección endógena y exógena (Trees *et al.*, 2005) y por la transmisión horizontal mediante la ingestión de ooquistes eliminados por el hospedero definitivo (Paré *et al.*, 1996).

2.3.2.1. Transmisión Transplacentaria Vertical

Es el principal modo de infección en el ganado bovino siendo el modo de propagación y mantenimiento de la enfermedad, también es llamada transmisión congénita. Esta vía ha sido también demostrada experimentalmente en ovinos, caprinos, ratones, caninos, felinos, porcinos y primates (Moore *et al.*, 2005). Las formas de transmisión transplacentaria vertical son la endógena y la exógena.

2.3.2.1.1. Infección transplacentaria endógena

Ahora está firmemente establecido que es el modo de transmisión más común de infección en el ganado. También se sabe que las vacas seropositivas son más probables de abortar que las vacas seronegativas. Esto sugiere que la reactivación de una infección persistente provocada posiblemente “por regulación” de las células mediadoras de inmunidad que se producen a mediados de la gestación.

El aborto puede presentarse en cualquier momento de la gestación, sin embargo, la mayoría de reportes mencionan mayor presentación de abortos entre los 5 y 6 meses de gestación (Anderson *et al.*, 1991, 1995; Wouda *et al.*, 1999).

La evidencia indica que la infección persistente de *N. caninum* en el ganado es limitado al Sistema Nervioso Central y músculo esquelético; probablemente en la forma de bradizoito dentro del quiste tisular (Dubey, 2007).

2.3.2.1.2. Infección transplacentaria exógena

Es una infección primaria en vacas que resulta de la ingestión de ooquistes esporulados de *N. caninum*, siendo probable que desenquisten en el intestino delgado, donde cada uno libera ocho esporozoitos, que se alojan en epitelio intestinal, transformándose en taquizoitos, sometidos a una fase de multiplicación posiblemente en los ganglios linfáticos mesentéricos y desde aquí los taquizoitos se liberan a la sangre diseminando el *N. caninum* a diversos órganos, dentro de los cuales se encuentra el útero grávido (Dubey, 2007).

2.3.2.2. Transmisión Transplacentaria Horizontal

La infección postnatal en el perro tiene lugar por ingestión de tejidos de bovinos infectados (fetos abortados y placentas), calostro o leche de origen bovino contaminados con taquizoitos de *N. caninum*. La infección causa la eliminación de los ooquistes en las heces del perro. Se ha señalado la presencia de *N. caninum* en la placenta demostrándose la eliminación de ooquistes en las heces de perros alimentados con placentas de vacas seropositivas. La presencia de ooquistes en perros naturalmente infectados se ha informado en escasas ocasiones.

La infección por transmisión horizontal del ganado bovino adulto tiene lugar luego que el hospedador definitivo elimina ooquistes que contaminan pastos, forrajes, agua y piensos almacenados. Por otro lado, la infección no fue detectada en el ganado bovino alimentado con placentas infectadas (Moore, 2005).

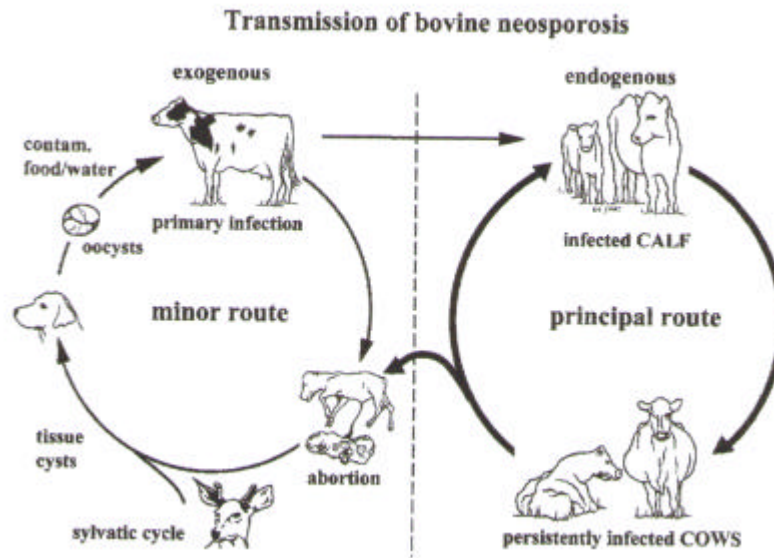


Figura 1. Esquema Transmisión Bovina de la Neosporosis (Fuente: Dubey *et al.*, 2006)

2.3.2.3. Patogenia Placentaria

En infecciones experimentales se ha demostrado que cuando *N. caninum* invade las células en el útero bovino, causa una destrucción focal por multiplicación del parásito tanto en la madre como en el tejido fetal, en la interface materno-fetal, provocando una respuesta inflamatoria no supurativa. Las primeras lesiones en las vacas inoculadas con taquizoitos a los 70 días de gestación se observaron a los 14 días (todos los fetos se perdieron después de esta fecha); consistían en la multiplicación del parásito en las vellosidades de la placenta del feto, con necrosis de las vellosidades, a veces con pérdida de suero fetal entre las vellosidades y el tabique materno y una inflamación no supurativa del septo materno.

Los análisis preliminares han demostrado que la afluencia de células inflamatorias maternas fue compuesta en gran parte por células CD4+, CD8+ y células T $\gamma\delta$ y la hibridación in situ mostró una proporción de las células en el infiltrado al ser capaz de producir IFN- γ . Esto nos indica que en algunos de los caso, la muerte del feto

no es tanto una consecuencia directa de la replicación del parásito sino debido a la respuesta inmune de la madre (Dubey *et al.*, 2006).

2.3.2.4. Patogenia Fetal

Coincidiendo con el inicio de la infección en la placenta, el parásito ingresa al torrente sanguíneo fetal e invade los futuros tejidos, con una predilección por el sistema nervioso central. Aquí el *N. caninum* se encuentra inicialmente en y los alrededores de los vasos sanguíneos. En el feto más joven, la multiplicación incontrolable puede causar una diseminación letal y generalizada con la destrucción del neuropilo, con poco o ningún foco de inflamación.

En los fetos de mayor edad se da una mayor respuesta al parásito, la multiplicación es más restringida y la necrosis es confinada a pequeños focos, rodeados por un infiltrado inflamatorio fetal conteniendo microglia, astrocitos reactivos y las células de la serie de los monocitos y linfoides, pudiendo estos focos mineralizarse. Los fetos abortados infectados, presentan necrosis multifocal y diseminación de infiltraciones mononucleares en muchos tejidos, incluyendo el corazón, músculo esquelético, pulmón e hígado. En algunos fetos, *N. caninum* puede causar lesiones características de inflamación y necrosis, con la demostración del parásito en tejidos como el hígado y corazón; mientras que en el cerebro, puede observarse una leucomalacia focal, lo que indica hipoxia fetal antes del nacimiento. Así, *N. caninum* es un patógeno primario capaz de causar aborto a través de la inflamación placentaria, necrosis placentar maternal y fetal o daño fetal o una combinación de los tres (Dubey *et al.*, 2006).

2.4. Inmunidad

El desarrollo completo de la capacidad inmunitaria depende del estímulo antigénico. Para la formación de células sensibles a antígenos se requiere la selección clonal y la multiplicación celular inducida por antígenos. Así pues, los mamíferos neonatos son vulnerables a la invasión durante las primeras semanas de vida. Necesitan ayuda para defenderse durante ese tiempo. Esta ayuda temporal la brinda la madre en

forma de anticuerpos y tal vez, de linfocitos T. La transferencia pasiva de inmunidad de la madre al neonato resulta esencial para la supervivencia de éste (Tizard, 2000).

Por ello para comprender mejor esta parte de la inmunidad de la madre, el feto y la infección con *Neospora caninum* vamos a revisar lo siguiente: La inmunidad durante la gestación, la inmunidad, gestación e infección por *N. caninum*, la respuesta inmune humoral y la respuesta inmune celular.

2.4.1. Inmunidad durante la gestación

La madre gestante adapta su metabolismo y sistema inmune proporcionando un medio homeostático y los nutrientes al “concepto” (placenta, feto y fluidos). Asimismo, la preñez está condicionada por mecanismos de tolerancia o rechazo. Factores ambientales externos (infecciones o estrés) pueden desequilibrar el balance madre – concepto ocasionando el aborto.

Favorecido por los altos niveles de progesterona, la respuesta inmune Th2 (mediada por linfocitos helper tipo2) mantiene la preñez mediante la producción de IL4 (interleuquina 4), IL5, IL6, IL9 e IL10 y reducción de la producción de moléculas pro – inflamatorias como IL12 e Interferón gamma (IFN γ), las cuales son perjudiciales para la vida fetal. Uno de los mecanismos más importantes de rechazo del feto involucra un desbalance entre la respuesta Th1/Th2 a favor de la respuesta Th1 y producción del IFN γ y otras citocinas asociadas a este tipo de respuesta. Las interleucinas IL-2, IL-3 y IL-12 promueven actividades citolíticas en macrófagos y NK (natural killer), activan la protrombina facilitando la coagulación y la trombosis y estimulan la producción de inmunoglobulinas que activan la cascada del complemento. Las infecciones que promueven una respuesta Th1 alteran el sincitiotrofoblasto. Más aún, el IFN γ es capaz de actuar directamente sobre este tejido induciendo abortos espontáneos (Moore *et al.*, 2005).

2.4.2. Inmunidad, gestación e infección por *Neospora caninum*

Las infecciones con parásitos Apicomplexa tiene efectos nocivos para la preñez. Sin embargo existen dos posturas controversiales que explican la fisiopatología de aborto causado por protozoos intracelulares. Primero, la preñez favorecida por una respuesta Th2 compromete la resistencia al parásito ocasionándose

parasitemia e infección transplacentaria. Segundo, una eficiente respuesta Th1 hacia el parásito podría comprometer la preñez. Un reciente trabajo que caracterizó la expresión génica de citoquinas en fetos y vaquillonas inoculadas a los 110 días de gestación describe que existió un balance entre las respuestas Th1/Th2. En dicho estudio se sugiere que la infección del huésped podría ser favorecida por la expresión de IL-4 e IL10 (respuesta Th2).

Durante un brote de abortos ocasionado por *N. caninum*, las vacas crónicamente infectadas resultaron menos propensas a sufrir pérdidas reproductivas que vacas infectadas recientemente, siendo la avidéz de la IgG en este último grupo. En contraste, se ha mencionado que la baja avidéz de anticuerpos no necesariamente está asociada con una reciente infección por *N. caninum* aunque puede ser un indicador de riesgo de aborto.

Investigando la dinámica de anticuerpos en vacas infectadas con *N. caninum* a lo largo de la gestación. Paré y col, describieron que aquellos animales con altos títulos séricos hacia el final del periodo de gravidez parían terneros clínicamente normales pero congénitamente infectados. Sin embargo, cuando los títulos séricos se incrementaban durante la mitad de la gestación existían altas probabilidades que se produzca el aborto. Adicionalmente, en otros estudios se postuló que la respuesta inmune de vacas preñadas infectadas naturalmente está asociada a la parasitemia, existiendo una elevación en la concentración de anticuerpos 4-5 meses antes de la parición.

Se ha sugerido que los estrógenos placentarios incrementados durante la mitad de la gestación bovina tendrían efectos negativos sobre la inmunidad mediada por células favoreciendo tanto la reactivación de bradizoitos como la parasitemia. Otros autores, atribuyen un efecto inmunosupresor debido a los elevados niveles de

progesterona existentes desde los primeros meses de la gestación hasta semanas antes del parto (Moore *et al.*, 2005).

La infección por *N. caninum*, acompañada por incrementos en los niveles de IFN γ ha sido postulada como mecanismo fisiopatológico del aborto. Otros autores sostienen que la limitada producción de IFN γ en respuesta a la presencia de IL-10 secretada por las células del trofoblasto, impediría el control de la multiplicación de *N. caninum* durante la preñez. Asimismo la reactivación de los bradizoitos desde los lugares de latencia podría deberse al descenso de los niveles de IFN γ (Moore *et al.*, 2005).

2.4.3. Respuesta Inmune Humoral

La cinética de anticuerpos de los animales con infección natural, demuestra que los títulos de anticuerpos incrementan, alterándose el estatus serológico del individuo con el paso del tiempo (Ortega *et al.*, 2001).

Las infecciones naturales y experimentales de animales logradas a partir de taquizoitos u ooquistes de *N. caninum* han permitido la caracterización de la inmunidad humoral o inmunidad mediada por anticuerpos. En animales tanto experimental como naturalmente infectados, la avidez de la IgG tiende a incrementarse con el curso de la infección, permitiendo la identificación de animales crónica o recientemente infectados.

Se ha postulado que el desarrollo de anticuerpos específicos probablemente limita la parasitemia o facilita la lisis de los taquizoitos extracelulares. Ratones deficientes de células B y de anticuerpos, murieron presentando lesiones de encefalitis necrotizante multifocal cuando fueron inoculados con *N. caninum*. En otros estudios

se investigó el rol de las células T utilizando ratones BALB/c, se concluyó que células CD4 $^{+}$ promovieron la producción de anticuerpos específicos, los cuales resultaron de importancia en la protección durante estadios avanzados de la enfermedad. Se determinó que en ratones luego de la infección con *N. caninum* predominaban los anticuerpos del isotipo IgG2, siendo bajos o nulos los niveles de IgG1. Estos hallazgos coinciden con lo encontrado en bovinos experimentalmente infectados, en los cuales

existió una respuesta dependiente de células cooperadoras Th1 asociada a la producción de IgG2 (Moore *et al.*, 2005).

2.4.4. Respuesta Inmune Celular

Los mecanismos dependientes de la inmunidad celular son relevantes para controlar un parásito intracelular obligado como el *N. caninum*, especialmente por su habilidad para evadir la respuesta inmune (Moore *et al.*, 2005).

La respuesta inmune relacionada con la protección es principalmente de tipo Th1, mediado por IL-12, con la producción de IFN γ , IL-2, factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y la presencia de células NK también productoras de IFN γ . Estos linfocitos Th1 son activados por epitopes expresados en la superficie de células presentadoras de antígenos (macrófagos, células dendríticas), asociados a moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH) clase II, promoviendo la respuesta citolítica y la inmunidad celular mediada por anticuerpos; asimismo cuando las proteínas antigénicas se procesan en el interior de las células, los epitopes también son presentados a los linfocitos citotóxicos (Lc) asociados a moléculas del CMH I (Hemphill *et al.*, 2006).

Se ha informado que un grupo de antígenos de bajo peso molecular de taquizoitos de *N. caninum* estimularon la proliferación in vitro de linfocitos T CD4 $^{+}$ obtenidos a partir de terneros experimentalmente infectados. Esta proliferación fue acompañada por un incremento en la concentración de IFN γ .

Experimentos realizados con ratones han permitido caracterizar la respuesta inmune celular sino también la dinámica de las citocinas durante las infecciones por *N. caninum*. La susceptibilidad de estas especies puede ser aumentada mediante la neutralización de IL-12 e IFN γ . La producción de IL-12 y luego de IFN γ , resulta un hallazgo constante luego de las infecciones experimentales. Sin embargo la IL-12 no fue capaz de impedir el progreso de la enfermedad. Se dice también que la neutralización de la IL-4 sumado a la inoculación de una cepa no virulenta de *N. caninum* y posterior desafío con una cepa virulenta, logró reducir la transmisión

vertical en ratones. La IL-10 también involucrada en la respuesta Th2, ha sido asociada a la depleción de IFN γ presente en ratones susceptibles a *N. caninum*.

Se conoce muy poco acerca del rol de las citocinas en respuesta a las infecciones por *N. caninum* en bovinos, la información es escasa. Pero algunos estudios indican que los mecanismos asociados a la respuesta Th1 con producción de IFN γ e IgG2 sería la adecuada para controlar la infección.

El rol del óxido nítrico (ON) resulta de interés, este metabolito originado a partir del nitrógeno y producido por macrófagos activados, tiene diversas funciones como la inmunosupresión y la destrucción de parásitos intracelulares (Moore *et al.*, 2005).

2.5. Signos Clínicos

2.5.1. Signos Clínicos en los Bovinos

El único signo observado es el aborto tanto en el ganado de leche como en el de carne; pudiendo ocurrir entre el tercer mes hasta el final de la gestación, sin embargo la mayoría de estudios señalan que las pérdidas se producen entre el quinto y sexto mes; y se sabe también que vacas con anticuerpos a *Neospora caninum* tienen mayor riesgo de abortar que aquellas seronegativas al parásito (Moore *et al.*, 2001; Dubey, 2003b).

Aún se desconoce si la *Neospora caninum* ocasiona pérdidas tempranas de preñez, sin embargo, en infecciones experimentales de vacas en distintos periodos de la gestación, quedo demostrado que la neosporosis durante las primeras dos semanas resultó en un desarrollo anormal del feto y reabsorción de los tejidos fetales a las tres semanas siguientes a la infección, y por el contrario, las infecciones producidas a las 30 semanas de gestación dieron como resultado el nacimiento de terneros congénitamente infectados pero sin signos clínicos., siendo esto observado comúnmente (Williams *et al.*, 2000).

El feto muerto en el útero puede ser reabsorbido, momificarse o expulsarse con avanzado grado de autólisis. Aunque no es patognomónico, la momificación es un hallazgo frecuente habiéndose descrito en casos naturales y experimentales. Los

terneros infectados en el útero pueden tener signos neurológicos y bajo peso al nacimiento. El examen clínico puede revelar ataxia, disminución del reflejo patelar o falta de sensibilidad propioceptiva, los miembros anteriores y/o posteriores pueden estar flexionados o hiperextendidos.

Eventualmente pueden presentarse anomalías congénitas como exoftalmia o asimetría ocular; ocasionalmente puede presentarse defectos al nacimiento como hidrocefalia, escoliosis y estrechamiento de la medula espinal sin embargo son escasos los trabajos que describan esta presentación de la enfermedad en neonatos (Moore *et al.*, 2001; Dubey, 2003).

2.5.2. Signos Clínicos en los Caninos

En los caninos la enfermedad se puede manifestar a cualquier edad, incluso se ha reportado neosporosis en perros desde los dos días de vida pero los casos más severos se presentan en animales jóvenes y cachorros congénitamente infectados (Barber *et al.*, 1998).

Los animales jóvenes van a desarrollar una parálisis progresiva ascendente que empieza con una parálisis del tren posterior, en la mayoría de los casos con una hiperextensión. Los miembros pélvicos se afectan con mayor gravedad que los torácicos. Se presenta una parálisis ascendente de los miembros con atrofia y rigidez muscular gradual que progresa hasta una contractura rígida de los músculos del miembro afectado (Barr *et al.*, 1997). Otras disfunciones incluyen dificultad para comer, parálisis mandibular, flacidez muscular, atrofia muscular y una insuficiencia cardíaca. (Dubey *et al.*, 1996). También se puede presentar una dermatitis que puede ser severa afectando a perros de cualquier edad; encontrando cuatro casos reportados de neosporosis cutánea incluyendo una infección mixta con *Leishmania* sp en un solo perro (Perlé *et al.*, 2001; Tarantino *et al.*, 2001; Ordeix *et al.*, 2002; Georgieva *et al.*, 2006).

Estudios experimentales señalan que *N. caninum* causa muerte fetal temprana, momificación, reabsorción fetal, nacimientos prematuros y nacimientos de cachorros débiles. La infección fetal puede producirse en cualquier momento de la gestación pero las consecuencias en el feto son más graves al inicio. No se conoce acerca de la

predisposición de la raza y el sexo, sin embargo, se ha descrito más casos en Labradores Retrievers, Boxers, Golden Retrievers, Basset Hounds (Dubey, 2003b).

2.5.3. Signos Clínicos en Ovinos y Caprinos

En rumiantes menores hasta el momento solo se ha reportado un caso de neosporosis congénita en un cordero con una sintomatología similar a la que se observa en terneros recién nacidos (Ortega-Mora *et al*, 1997).

Las infecciones experimentales, han comprobado que el momento de la gestación en que tiene lugar la infección es determinante para la presentación de abortos o mortinatos. Por ejemplo en un estudio en ovinos, todos los animales infectados a los dos meses de gestación abortaron. Infectados a los tres meses una porción abortó y otras parieron corderos débiles y unos cuantos corderos normales. De los infectados a los 4 meses, ninguno abortó y los corderos nacieron aparentemente normales (Ortega-Mora *et al*, 1997).

En cabras una infección temprana cursa con muerte, reabsorción fetal o expulsión de fetos con autólisis. Una infección media da cabritos normales con infección subclínica, siendo pocos los casos de mortinatos. La infección en la última fase da lugar a nacimientos de cabritos débiles que fallecen a los pocos días. En los fetos los hallazgos histológicos han sido muy semejantes a los encontrados en terneros (Ortega-Mora *et al*, 1997).

2.5.4. Signos Clínicos en otras especies

En equinos tenemos a la *Neospora hughesi* como causante de mieloencefalitis equina (Marsh *et al*, 1996).

En felinos específicamente en gatos se reportó una infección natural en Sao Paulo y Guarulhos- Brasil; de un total de 502 muestras de suero, se halló 11.9 % de anticuerpos contra *N. caninum* mediante la prueba del NAT (nucleic acid testing) y las lesiones histopatológicas reportadas experimentalmente fueron compatibles con encefalomielitis, polimiositis y hepatitis con lesiones primarias (Dubey *et al.*, 2002).

En el 2004 se reportó la presencia de anticuerpos contra *N. caninum* en Camélidos Sudamericanos mediante la técnica de IFI. El estudio se realizó en 78 alpacas (*Lama pacos*) y 73 llamas (*Lama glama*) utilizando una dilución de 1:50. Los resultados a la prueba fueron de 28/78 (alpacas) y 23/73 (llamas) (Chávez *et al.*, 2004).

2.6. Lesiones en Bovinos y Caninos

Las lesiones se observan mayormente en el SNC, hígado y músculo esquelético. En el cerebro la inflamación se distribuye multifocalmente, con zonas de necrosis y atrofia, las lesiones neuronales consisten en encefalomyelitis y ocasionalmente calcificación. La lesión característica en el SNC es una necrosis rodeada por infiltración de células mononucleadas (Dubey *et al.*, 1996).

En un estudio realizado en 82 fetos bovinos se observó en un 100 % encefalitis y miositis seguido de adrenalitis, miositis, nefritis, hepatitis, placentitis y neumonía. La lesión miocardial puede presentar autólisis y Las lesiones hepáticas consisten en una infiltración periportal de células mononucleadas y focos de necrosis hepatocelular (Barr *et al.*; 1991b).

Neospora caninum causa muerte celular acompañada por lesiones necróticas visibles en varios días, debido a una activa replicación de los taquizoitos, provocando daños en la conductividad nerviosa-muscular, causada por la destrucción de células nerviosas, así como daño cerebral y de la médula espinal (Georgieva *et al.*, 2006).

Tanto en bovinos y caninos las lesiones observadas incluyen: miositis necrotizante multifocal del músculo cardíaco, además la lesión miocardial puede presentar autólisis; lesiones hepáticas que consisten en un edema portal con degeneración hidrópica, infiltrado de células mononucleares a nivel periportal, además de focos de necrosis hepatocelular; a nivel pulmonar se observa necrosis focal con exudado fibrinoso e infiltración de células inflamatorias además de hiperplasia epitelial alveolar; además de otras lesiones observadas como nefritis intersticial focal, pancreatitis necrotizante multifocal y una severa dermatitis, reportada sólo en perros, con presencia de úlceras cutáneas focales o multifocales donde se observan taquizoitos además de necrosis (Barber, 1998; Basso *et al.*, 2005; Mc Allister, 2005).

2.7. Diagnóstico.

En primer lugar el diagnóstico de la neosporosis se debe basar en la historia clínica, los signos clínicos, las lesiones macroscópicas y microscópicas en los tejidos fetales, en cuyo caso la presencia del parásito puede ser confirmada por técnicas inmunohistoquímicas (Lindsay *et al.*, 1989; Anderson *et al.*, 1991; Wouda *et al.*, 1997b). También existen pruebas serológicas como la prueba de Inmunofluorescencia Indirecta (IFI), la prueba de Aglutinación Directa y diferentes ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas -ELISA- (Björkman *et al.*, 1999). Recientemente la técnica de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) ha permitido un gran avance en el diagnóstico sin embargo no es muy usado por su elevado costo (Dubey, 1999).

2.7.1. Diagnóstico Serológico

Entre las más utilizadas tenemos: la Inmunofluorescencia Indirecta (IFI), Aglutinación Directa (DAT), Inmunoblot (IB), Prueba Rápida Inmunocromatográfica (ICT), Ensayo Inmunoabsorbente Ligado a Enzimas (ELISA).

2.7.1.1. Inmunofluorescencia Indirecta (IFI)

Fue la primera técnica utilizada en el diagnóstico serológico de la neosporosis, actualmente se la usa como prueba estándar para la comparación con otras técnicas (Ortega-Mora *et al.*, 2006). También se le emplea en estudios epidemiológicos para detectar anticuerpos anti-*Neospora caninum* en un gran número de especies animales como: perros, zorros, gatos, bovinos, ovinos, caprinos, búfalos de agua, equinos, roedores y primates (Dubey *et al.*, 1996; Björkman *et al.*, 1999).

La inmunofluorescencia indirecta (IFI) es empleada para la detección de anticuerpos contra el *N. caninum*. Para el desarrollo de esta prueba se emplean taquizoítos y conjugado anti-IgG de la especie estudiada; los taquizoítos son cultivados en diferentes líneas celulares, y luego son fijados en láminas de microscopia, las cuales inicialmente son incubadas con sueros diluidos, y en un segundo periodo con anticuerpos marcados con fluoresceína (conjugado anti-IgG), el cual va dirigido contra las inmunoglobulinas del suero problema; se considera un resultado positivo cuando se

observa la fluorescencia en toda la superficie del taquizoito y negativo cuando la fluorescencia queda restringida a la parte apical del taquizoito (Björkman *et al.*, 1999).

El punto de corte varía entre laboratorios, desde 1:100 hasta 1:640 para bovinos adultos y desde 1:16 hasta 1:80 para serología fetal (Björkman *et al.*, 1999, Álvarez-García *et al.*, 2003). Un punto de corte recomendado en IFI para detectar la infección es 1:200 para ganado bovino adulto (von Blumróder *et al.*, 2004) y 1:16-1:25 en fluidos fetales (Álvarez-García *et al.*, 2003).

Esta prueba serológica es considerada específica y sensible para detectar anticuerpos contra *N. caninum* en fluidos fetales, para esto se usa un menor título que indique una respuesta específica (Wouda *et al.*, 1997a; Barr *et al.*, 1995; Otter *et al.*, 1997; Slotved *et al.*, 1999). La detección de anticuerpos por IFI puede diagnosticar falsos positivos, si se emplea suero fetal bovino como medio de cultivo celular que a menudo contiene anticuerpos de *N. caninum*, como se encuentra en la US y Europa (Dubey *et al.*, 2006).

IFI es considerada prueba de referencia pues detecta anticuerpos tanto en animales adultos como en fetos abortados o neonatos muertos. Como prueba específica, sus márgenes de reacción cruzada con otros protozoos del Phylum Apicomplexa, incluido *T. gondii* son mínimas. Los títulos establecidos son de 1:50 para caninos y 1:160-1:640 para bovinos, alcanzando una sensibilidad y especificidad de 98 % y 99 % respectivamente (Thurmond *et al.*, 1997).

2.7.1.2. Aglutinación Directa (DAT)

Es una prueba serológica bastante específica, tiene como característica el no requerir conjugados de difícil adquisición pudiendo ser usado en un amplio rango de hospederos, tiene alta repetibilidad entre operarios, es barata, de fácil lectura y utiliza poco equipamiento y materiales (Romand *et al.*, 1998).

El principio de esta técnica se basa en el uso de taquizoitos aislados de *Neospora caninum* BPA-1 y Nc-1 fijados en formalina, los cuales mediante procesos de dilución del suero con solución de fosfato salino buferada (PBS) con un pH de 7.2, aglutinan

ante la presencia de anticuerpos específicos, destruyendo las IgM mediante el tratamiento con mercaptenol, detectando únicamente las IgG (Packham *et al.*, 1998; Romand *et al.*, 1998).

2.7.1.3. Inmunoblot (IB)

Esta técnica generalmente se usa como apoyo a otras pruebas serológicas (IFI y ELISA) para establecer valores de concordancia y puntos de corte, siendo

considerada una técnica esencial para la determinación de antígenos inmunodominantes (Atkinson *et al.*, 2000). Para el caso de animales infectados con *N. caninum* reconoce predominantemente antígenos con un peso molecular de 17, 29-30 y 37Kda. En IB un resultado es considerado positivo cuando dos o tres de cuatro antígenos inmunodominantes están presentes (Bjerkas *et al.*, 1994).

2.7.1.4. Prueba Rápida Inmunocromatográfica (ICT)

En el 2005 se reportó el desarrollo de una prueba inmunocromatográfica (ICT) que empleaba un antígeno de superficie recombinante-1 de *N.caninum* (NcSAG1), para la detección rápida de anticuerpos específicos contra *Neospora caninum* en el ganado. Esta técnica presentó una buena correlación con la prueba de ELISA. El ICT es un método simple, rápido, características que lo hacen ideal para aplicaciones clínicas y de campaña; sin embargo desde su reporte inicial en el 2005, no se han presentado mayores estudios al respecto (Liao *et al.*, 2005).

2.7.1.5. Ensayo Inmunoabsorbente Ligado a Enzimas (ELISA)

La prueba de ELISA ha sido ampliamente utilizada en el serodiagnóstico de la neosporosis, por la facilidad que tiene para procesar un gran número de muestras, la obtención de una sensibilidad y especificidad superiores a las obtenidas con IFI, sumado a la falta de subjetividad cuando se debe emitir un resultado, hacen confiable a esta prueba (Moore *et al.*, 2001).

En la actualidad existen modificaciones de ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA), que permiten su empleo en estudios epidemiológicos, utilizan

distintos tipos de antígenos como: taquizoitos sonicados (aplicación de ultrasonido, cuya agitación provoca destrucción de membrana celular), taquizoitos fijados con formalina, antígenos recombinantes y antígenos incluidos en partículas iscom (Williams *et al.*, 1997).

Dentro de los tipos de ELISA, el más utilizado es ELISA indirecto, el cual emplea antígeno soluble de taquizoito, mezcla de antígenos intracelulares y de

membrana de los diferentes aislados de *Neospora caninum* BPA1 y NC-1; puede ser usado con muestras de suero, leche y líquidos fetales para la detección de anticuerpos, además los resultados pueden ser expresados como valores de Densidad Óptica (OD), valores Porcentuales de Positividad (PP), o valores de cociente entre Muestra/Control Positivo (S/P) (Ortega-Mora *et al.*, 2006).

Tenemos también el ELISA de avidez, el cual es una modificación del ELISA indirecto, que permite analizar la avidez de IgG, basándose en que los primeros anticuerpos sintetizados después de la infección primaria tienen baja afinidad con respecto a los producidos posteriormente, los cuales se relacionan con infección crónica, resultando útil como herramienta para investigar la duración de la infección (Björkman *et al.*, 1999, 2005; Ortega-Mora *et al.*, 2006).

El ELISA Iscom, es un ELISA soluble, el cual usa como antígeno un extracto de taquizoitos incorporado a un complejo inmunoestimulante; emplea partículas "iscoms" que son estructuras de 40nm compuestas por Quil A (un derivado de saponina), colesterol, fosfolípidos y a las que se le añade el antígeno, el cual contiene extractos proteicos de membrana y de compartimientos intracelulares, cuyo peso varía entre 18-61kDa, proveniente de taquizoitos de *Neospora caninum* NC-1; incrementando la especificidad del ELISA, logrando disminuir el número de proteínas intracelulares causantes de uniones inespecíficas o reacciones cruzadas (Björkman *et al.*, 1994).

Otros tipos de ELISA son: ELISA de competición, que consiste en una prueba indirecta en la cual se utiliza un anticuerpo monoclonal que compete con los anticuerpos específicos del suero problema por los epítomos disponibles del antígenos fijado en la

placa (Baszler *et al.*, 1996) y el ELISA sandwich, desarrollado por Schares et al, (1999) para la detección de anticuerpos contra *Neospora caninum* en bovinos.

La técnica de ELISA, tiene la ventaja del costo/tiempo, ante exámenes de un gran número de muestras de suero de bovinos, lo cual es aplicable en hatos en los cuales es necesario el análisis de un gran número de animales. En cuanto a especies menores, los laboratorios de diagnóstico veterinario, reciben pocas muestras, tal es el caso de las muestras de perros, por lo cual en estos casos el IFI es utilizado como examen de rutina, por causa de su flexibilidad (Björkman *et al.*, 1999).

Cuadro 8. Pruebas de diagnóstico serológico de *N. caninum* comercialmente disponibles

Nombre comercial	Prueba	Laboratorio
BIOVET <i>Neospora caninum</i>	ELISA indirecto	BIOVET, Canadá
CHEKIT <i>Neospora</i> Dr. Bommeli / IDEXX	ELISA indirecto	IDEXX, Países bajos
CIVTEST BOVIS <i>NEOSPORA</i>	ELISA indirecto	HIPRA, España
Cypress Diagaostic C.V. <i>Neospora caninum</i>	ELISA indirecto	Cypress Diagnostics, Bélgica
HerdChek IDEXX	ELISA indirecto	IDEXX, USA
MASTAZYME <i>Neospora</i>	ELISA indirecto	MAST GROUP, Reino Unido
<i>Neospora caninum</i> blocking ELISA	ELISA competitivo	Institut Pourquier, Francia
P38-ELISA	ELISA indirecto	AFOSA GmbH, Alemania
ImrnunoComb bovine <i>Neospora caninum</i>	ELISA DOT	Biogal, Israel
SVANOVIR <i>Neospora-Ab</i> ELISA	ELISA indirecto	SVANOVA Biotech AB, Suecia
VMRD <i>Neospora caninum</i> cELISA	ELISA competitivo	VMRD, USA
VMRD <i>Neospora caninum</i> FA substrate slide	IFAT	VMRD, USA

Fuente: Dubey et al., 2006

2.7.2. Diagnóstico No Serológico

2.7.2.1. Aislamiento del Parásito

En el 2001 se logra el primer aislamiento de *Neospora caninum* del sistema nervioso central de un perro infectado, luego en California se logra el aislamiento de un feto bovino abortado; posteriormente se pudo aislar también *N. caninum* del sistema nervioso central de una vaca adulta infectada naturalmente que abortó por este parásito (Moore *et al.*, 2001).

Este método puede realizarse tanto in vivo como in vitro. In vivo al inocular ratones con ooquites expulsados en las heces de perros, así se pudo determinar al perro como hospedero definitivo del *N. caninum*. El protozoo puede mantenerse in vivo mediante inoculación de Meriones unguiculatus, los cuales son altamente susceptibles. Los taquizoítos pueden multiplicarse en las células peritoneales de los meriones y así ser transferidos mediante inóculos sucesivos (Mc Allister *et al.*, 1998a).

Neospora caninum ha sido cultivado in vitro con monocitos bovinos, células endoteliales de arteria cardiopulmonar bovina, células de riñón bovino, fibroblastos humanos, células Vero (células renales de mono verde africano) y otras líneas celulares en donde sólo taquizoítos han sido observados, manteniéndose infectivos hasta por ocho años. La criopreservación de taquizoítos en nitrógeno líquido es una alternativa válida sin pérdida de la infectividad para los cultivos celulares (Dubey *et al.*, 1996; Moore *et al.*, 2001).

2.7.2.2. Examen Histopatológico

Es una técnica de diagnóstico relevante en las infecciones por *N. caninum*. Se basa en la presencia de lesiones características del parásito como meningoencefalitis necrotizante multifocal (MENM), miocarditis, miositis, nefritis, hepatitis, neumonía y adrenalitis focales no supurativas caracterizadas por la presencia de células mononucleares. Aunque su sensibilidad es baja, probablemente debido a los escasos parásitos presentes en tejidos autolizados, resulta una técnica diagnóstica vigente (Anderson *et al.*, 2000).

El examen histopatológico se puede realizar en los tejidos de fetos abortados teñidos con hematoxilina- eosina. Los órganos más importantes para el examen son el cerebro, corazón y el hígado (Dubey, 2003a). También pueden mandarse pulmón, bazo, riñón, músculo estriado que son fijados en formalina al 10%, para luego fijarse en parafina, teñirse con hematoxilina-eosina (H-E) y ser vistas al microscopio (Basso *et al.*, 2005),.

Los quistes titulares pueden estar en cualquier área del cerebro y el corazón. En el cerebro se observan lesiones características en el tronco encefálico y los pedúnculos cerebelosos, necrosis focal y microgliosis dispersa en la corteza particularmente en las zonas adyacentes a los vasos sanguíneos de la interfase de la materia gris y blanca. En el corazón, hay un infiltrado celular mononuclear en el pericardio, miocardio y endocardio, con necrosis multifocal asociada con una leve mineralización y definida como una miocarditis no supurativa (Boulton *et al.*, 1995).

2.7.2.3. Inmunohistoquímica (IHQ)

La inmunohistoquímica (IHQ); realizada sobre tejidos fetales formolizados con lesiones histopatológicas compatibles, permite la identificación de *Neospora caninum* con alta especificidad, adquiriendo un valor diagnóstico relevante; y aunque su sensibilidad es baja, probablemente debido a los escasos parásitos presentes en tejidos autolizados, resulta una técnica diagnóstica vigente (Moore *et al.*, 2001).

Es importante mencionar que la Inmunohistoquímica es eficaz para detectar los parásitos por la presencia de anticuerpos de *Neospora caninum* en fetos bovinos y que no existe reacción cruzada con *Toxoplasma* o *Sarcocystis* lo cual hace que la prueba sea muy específica (Barr *et al.*, 1995). La inmunohistoquímica (IHQ) es la técnica más usada para demostrar la presencia de *Neospora* en los tejidos (Lindsay *et al.*, 1989). En las técnicas inmunohistoquímicas pueden emplearse tanto anticuerpos específicos monoclonales o policlonales de *N. caninum* (Cole *et al.*, 1994; Lindsay *et al.*, 1989).

2.7.2.4. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La técnica PCR ha permitido un gran avance en el diagnóstico de las enfermedades infecciosas por ser extremadamente sensible y específica, y en el diagnóstico de la neosporosis bovina su impacto ha sido notable permitiendo esclarecer ciertos aspectos epidemiológicos, sin embargo no es una técnica de rutina por su elevado costo (Moore *et al.*, 2001).

Se basa en la identificación y amplificación de algún segmento de ADN que esté presente en todos los estadios del ciclo biológico en una gran variedad de tejidos, permitiendo diferenciar a *Neospora caninum* de otros protozoos (Dubey, 1999). Entre las técnicas que se utilizan se tiene las que se basan en la amplificación de la región ITS1 del ADN ribosomal, en la amplificación de los segmentos de la región Nc5 del ADN genómico y las que utilizan el gen 14-3-3 (Ortega-Mora, 2001).

En PCR se puede utilizar tanto muestras de animales muertos (Eperon *et al.*, 1999), como de animales vivos naturalmente infectados, utilizando PCR en tiempo real, en abortos infectados y vaquillas gestantes, mostrando que existe una mayor concentración de ADN parasitario en el cerebro, comparado con la sangre (Okeoma *et al.*, 2004).

2.8. Tratamiento

La mayoría de los estudios de eficacia de fármacos contra *Neospora caninum* proceden de pruebas in Vitro y las realizadas en ratones, obtenidos principalmente en cultivos celulares del parásito. Cabe señalar que los tratamientos quimioterapéuticos no son eficaces en la fase de enquistamiento o fase de bradizoito in vivo. In vitro se ha encontrado cierta efectividad en fase de taquizoito, agregando drogas utilizadas para el tratamiento del *Toxoplasma gondii*. Por lo expuesto, son de escasa utilidad práctica; se ha demostrado que las sulfonamidas, los inhibidores de la dihidrofolato reductasa/tinilidato sintetasa (diaveridina, metotrexato, pirimetamina y trimetropin), los antibióticos ionóforos, macrólidos, tetraciclinas y las lincosamidas, tienen cierta actividad contra *Neospora caninum*. En cambio, otras drogas, como el metronidazol,

amprolio y paramomicina, muy eficaces contra *Toxoplasma gondii*, tienen escasa o ninguna acción contra la Neosporosis (Dubey *et al.*, 1996).

Se conoce de la sensibilidad in vitro de *Neospora caninum* a ciertos antimicrobianos; de un total de 43 sustancias probadas, 17 ocasionaron una reducción total del número de taquizoítos cultivados in vitro. Dentro de las drogas más efectivas se encuentran la clindamicina, diclazuril, robenidina y pirimetamina; sin embargo la eficacia de dichas drogas en bovinos no han sido aún estudiadas.

Se ha informado que utilizando toltrazuril y ponazuril, derivados de la triazinona utilizada en el tratamiento de las coccidiosis en mamíferos, se logró disminuir las lesiones cerebrales de terneros inoculados experimentalmente, actualmente no existe tratamiento en los bovinos que los libere de la enfermedad (Moore *et al.*, 2005).

En el caso de la neosporosis neonatal canina caracterizada por paresias y parálisis del tren posterior, puede ser tratada con clindamicina oral en dosis de 12.5 a 18.5mg/kg p.v. suministrada dos veces al día durante dos a cuatro semanas. También resulta eficaz la combinación de pirimetamina y sulfonamidas en dosis de 0.25 a 0.5 y 30mg/kg p.v. respectivamente cada 12 horas en forma oral durante cuatro semanas. Este tratamiento no previene que los caninos eliminen los ooquistes en las heces (Lindsay *et al.*, 1999).

2.9. Control y Prevención

Hace más de una década se viene hablando del uso de vacunas para disminuir la ocurrencia de abortos bovinos. En 1999, laboratorios Bayer probó una vacuna, usando niveles de dosaje de taquizoítos derivados de 2 diferentes cultivos tisulares. Las vacas en estudio, seroconvirtieron eficazmente post-infección; sin embargo, el uso de la vacuna, aun no ha sido muy difundida como medio de protección contra abortos (Bayer, 1999).

El departamento de agricultura de los EE.UU ha aprobado el uso de una vacuna inactivada que contiene organismos muertos de *Neospora caninum*, esta vacuna ha sido desarrollada por Laboratorios Intervet (Bovilis Neoguard®), y señala que es una vacuna segura para su uso en bovinos preñados sanos. En uno de sus ensayos, vaquillonas preñadas vacunadas con 2 dosis a los 56 y 77 días de gestación en forma subcutánea fueron posteriormente desafiadas con un inoculo intramuscular a los 95 días de gestación. El grupo de 18 animales sin inmunizar tuvo una tasa de abortos del 22%. Las 18 vaquillonas inmunizadas tuvieron terneros vivos y sanos. Otros estudios realizados reportaron fallas de la vacuna para conferir protección del hato contra el aborto, por lo cual aún queda en duda la aplicabilidad de esta vacuna.

Hay ventajas y desventajas al usar una vacuna viva o atenuada en la neosporosis bovina. Al utilizar una vacuna viva, el protozoo replicaría de las células, ocasionando que el antígeno parasitario sea presentado con antígenos del CMH (Complejo Mayor de Histocompatibilidad) clase 1 quedando satisfecha la estimulación de linfocitos T CD8+, los cuales son importantes en los mecanismos de protección. Al aplicar una vacuna inactivada, por ejemplo taquizoítos de *N. caninum*, se estaría estimulando el procesamiento de un antígeno exógeno. Por el contrario, en la enfermedad natural se generaría el procesamiento de antígenos endógenos por ser *N. caninum* un parásito intracelular obligado, siendo de esta manera disímil la respuesta celular generada. Sin embargo, queda por dilucidarse si una vacuna, aun siendo inactivada, no protege contra el aborto en rodeos naturalmente expuestos. Más aún, existen graves desventajas al usar una vacuna viva existiendo posibilidad de ocasionar infección crónica y transmisión vertical persistente (Moore *et al.*, 2005).

Ya que se ha comprobado una asociación epidemiológica entre perros y vacas con serología positiva es recomendable disminuir el contacto entre estos animales. En este sentido debe disminuirse la contaminación fecal de alimentos y agua. Para cortar el ciclo hacia el hospedero definitivo, además se deben retirar los tejidos potencialmente infectados como fetos abortados, membranas fetales y eliminarlos correctamente (Dubey, 1999; Anderson *et al.*, 2000; Dijkstra *et al.*, 2001).

Debido a que la principal vía de transmisión es la vertical y que vacas seropositivas a *N. caninum* tienen mayor riesgo de abortar, se podría disminuir el número de vacas positivas o congénitamente infectadas en el predio, como también no introducir nuevos animales con estas características (Paré *et al.*, 1998; Anderson *et al.*, 2000; Dubey, 2003). En predios con baja prevalencia de la enfermedad podría ser recomendable evitar la cruce o inseminación de vacas seropositivas, disminuyendo así la transmisión vertical (Hall *et al.*, 2005).

Otras medidas de control de la neosporosis podrían incluir la transferencia de embriones a vacas negativas a Neospora, ya que es improbable que este patógeno se transmita por esta vía debido a que los embriones bovinos con zona pelúcida intacta en estado de preimplantación son resistentes a la invasión de este parásito. De esta manera se estaría también controlando la transmisión vertical de la enfermedad. La vaca donadora positiva a neospora será estimulada hormonalmente para producir varios embriones en forma simultánea, los cuáles serán recuperados y transferidos a vacas receptoras libres de neospora. De esta manera, los embriones tendrán la calidad genética de la madre donadora pero serán retirados antes que ocurra la transmisión transplacentaria (Dubey, 2003).

Dada la amplia distribución de esta enfermedad en los bovinos se sugiere además diferentes medidas de manejo como:

- 1) Reponer animales seronegativos a la enfermedad. Para esto debe muestrearse sangre del animal recién nacido previo al calostro. De no ser posible la obtención de sangre podría realizarse a los 5-6 meses de edad cuando no haya interferencia de anticuerpos calostrales.
- 2) No dejar las hijas de las vacas seropositivas para reposición dado su alto riesgo de ser congénitamente infectadas.
- 3) Es aconsejable realizar al menos dos muestreos de sangre previos al primer servicio de vaquillonas debido al alto riesgo de aborto que tiene esta categoría por su pobre memoria inmunológica.

- 4) Debe muestrearse todo animal que entre al establo a fines de identificar animales seropositivos a *N. caninum*.
- 5) Realizar el seguimiento del desempeño reproductivo del establo especialmente en establecimientos lecheros con elevada seroprevalencia a fin de detectar pérdidas de preñeces y/o fetos momificados mediante tactos rectales seriados.
- 6) Identificar a las vacas seropositivas y que hayan tenido al menos un aborto para ser reemplazadas a posterior.
- 7) Identificar, aislar y realizar estudios serológicos de vacas abortadas.
- 8) Recuperar fetos y placentas abortados para enviarlos a centros de diagnóstico a fin de establecer el agente abortigénico.
- 9) No permitir el acceso de perros al establo ni a los almacenes de alimento ni a fuentes de agua (Moore *et al.*, 2001)

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Lugar del estudio

3.1.1. Ubicación

El estudio se realizó en los establos lecheros ubicados en la cuenca izquierda del Valle del Mantaro, comprendiendo los distritos de Concepción, Matahuasi, 9 de Julio y Santa Rosa, provincia de Concepción, entre los meses de agosto y setiembre del 2010. El Valle del Mantaro se encuentra a una altitud de 3,150 a 3,500 msnm; longitud sur de 11° 55', longitud oeste de 75° 18' perteneciente al departamento de Junín. (IGP, 2011).

3.1.2. Animales

Se tomaron muestras de sangre de vacas de establos lecheros de crianza intensiva, extensiva y semi intensiva cuya raza predominante era Brown Swiss, entre dos a nueve años de edad. Además todos los hatos evaluados manifestaron haber presentado al menos un caso de aborto en los últimos 5 años.

3.1.3. Clima

Las lluvias en el Valle del Mantaro acumulan en promedio 700 mm al año. La temperatura máxima es de 23.6 °C, la mínima de 4.3 °C. Entre abril y agosto es la época de seca y de setiembre a diciembre es el inicio de la época lluviosa; es en esta época es donde se reportan un promedio de 90 a 124 mm/mes (Senamhi, 2011).

3.1.4 Pasturas

En la crianza semi extensiva y extensiva la alimentación es en base a pastos naturales, básicamente trébol blanco y rye grass; y en los establos de crianza intensiva la alimentación del ganado es tipo ensilados de maíz.

3.2. Materiales

Los materiales empleados para cada una de las actividades concernientes a la detección de anticuerpos contra *N. caninum* en bovinos fueron:

- **Sangre:** Obtenidos en tubos vacutainers sin anticoagulante de 5ml, Agujas N° 20 x 1 ½” de doble salida, viales para la recolección de suero.
- **Kit diagnóstico:** Kit serológico para la detección de anticuerpos contra *Neospora caninum* IDEXX, tips, micropipetas, centrífuga.
- **Equipos:** Refrigeradora y Lectora Elisa.

3.3. Tamaño muestral

El número de animales para el estudio se determinó aplicando la fórmula para estimar una proporción, utilizando como prevalencia referencial de neosporosis 12.8% (Puray,2005) en la Sierra Central.

$$n = \frac{Z^2 p q}{d^2}$$

donde:

n: Tamaño muestral mínimo

Z: Nivel de confianza (95%).

p: Proporción referencial 0.128 (Puray, 2005).

q: 1-p

d: Error máximo permisible (5%).

El tamaño de muestras mínimo es de 172 bovinos.

El estudio se realizó en los distritos de Matahuasi, Concepción, 9 de Julio y Santa Rosa de la provincia de Concepción, departamento de Junín por ser los más próximos a la cuenca izquierda del río Mantaro que atraviesa el valle.

Para una mejor estimación de la prevalencia, el tamaño de muestra se estratificó proporcionalmente al tamaño poblacional de los distritos considerados en el estudio, utilizando la fórmula para estratificación de muestras (Daniel, 1996).

$$n_h = \frac{N_h}{N} n,$$

donde:

n_h : Tamaño de muestra del estrato h (distrito).

N_h : Tamaño de población del estrato h.

N : Población total.

n : Tamaño muestral.

Cuadro 9. Estratificación de Bovinos Lecheros a muestear según distritos, Provincia Concepción – Junín

Estratos (distritos)	Población distrital de Bovinos Lecheros*	Tamaño de muestra
Matahuasi	2099	79
Concepción	870	33
9 de Julio	864	32
Santa Rosa	744	28

*CENAGRO – INEI 1994

3.4. Recolección de Muestras

Las muestras de sangre se obtuvieron por punción directa de la arteria coccígea media, utilizando vacutainers estériles sin anticoagulante y agujas de 20 x 1½, se extrajo aproximadamente 5 ml de sangre de cada animal. Las muestras fueron guardadas en un cooler con hielo para mantener la cadena de frío hasta la llegada al laboratorio de Microbiología del IVITA – Mantaro donde se centrifugó a 3,000 rpm para obtener los sueros, los cuales fueron depositados en viales de 2 ml debidamente identificados y conservados en congelación a -20°C hasta su procesamiento.

3.5. Procesamiento de las Muestras

Se realizó en el Laboratorio de Parasitología Veterinaria de la Facultad de Medicina Veterinaria de la UNMSM, donde se aplicó la técnica de ELISA indirecto para la detección de anticuerpos contra *N. caninum*, mediante un kit comercial HerdChek Anti-Neospora de IDEXX.

3.6. Desarrollo de la técnica de ELISA

- Las muestras de suero se diluyeron a razón de 1:100 con el diluyente para muestra. No se diluyeron los controles.
- El concentrado para lavado comercial se diluyó 1:10 con agua destilada desionizada.
- Se adicionaron 100 µl de control negativo sin diluir en los pozos A1 y B1 de la placa antigenada.
- También se adicionaron 100 µl de control positivo sin diluir en los pozos C1 y D1 de la placa antigenada.
- Se añadieron 100 µl de cada muestra animal diluida en los siguientes pozos de la placa antigenada.
- Luego se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente.
- **1er Lavado:** Se lavó cada pozo 5 veces con 200 µl de solución de lavado.
- Se añadieron 100 µl de conjugado antibovino: Ig G en cada pozo.
- Se incubaron otra vez durante 30 minutos a temperatura ambiente.
- **2do Lavado:** Se volvió a lavar cada pozo 5 veces con 200 µl de solución de lavado.
- Se adicionaron 100 µl de solución de sustrato TMB en cada pozo de la placa.
- Se incubaron 15 minutos más a temperatura ambiente.
- Finalmente se añadieron 100 µl solución stop en cada pozo de la placa para detener la reacción.
- Se procedió a medir y leer la absorbancia en la lectora Elisa (Filtro: 650 nm).

Interpretación de los Resultados

El ensayo es válido cuando la diferencia entre el promedio del control positivo y el promedio del control negativo es mayor o igual que 0.50.

Las muestras de suero con cocientes S/P menores que 0,50 se clasifican como **NEGATIVAS** hacia los anticuerpos contra Neospora.

Si el cociente S/P es mayor o igual que 0,50 las muestras se clasifican como **POSITIVAS** hacia los anticuerpos contra Neospora.

3.7. Análisis de los datos

3.7.1. Prevalencia (P)

Luego de determinar el número de muestras positivas, se procedió a calcular la prevalencia de *Neospora caninum* de los distritos estudiados utilizando la siguiente fórmula (Daniel, 1996):

Formula:

$$p = \frac{\text{Número de muestras positivas} \times 100}{\text{Total de muestras}}$$

3.7.2. Intervalo de Confianza (IC)

Se estimó por la siguiente fórmula (Daniel, 1996):

Formula:

$$IC = p \pm Z \sqrt{pq/n}$$

donde:

p= Prevalencia

q= 1-p

Z= 95% de nivel de confianza

n= Tamaño muestral

IV. RESULTADOS

El cuadro 10 evidencia la frecuencia relativa porcentual de bovinos lecheros positivos a *Neospora caninum* en 15 establos evaluados de cuatro distritos muestreados, encontrándose de un total de 182 animales, una frecuencia de 46.7%.

En el cuadro 11 se muestra la frecuencia relativa porcentual de *Neospora caninum* según tipo de crianza (intensivo, semi-intensivo y extensivo), cuyos resultados son relativamente uniformes variando de 44.1 hasta 50%. Sin embargo, los distritos de 9 de julio y Santa Rosa, no cuentan con establos de crianza intensiva y semi-intensiva, respectivamente.

Cuadro 10. Frecuencia relativa porcentual de bovinos lecheros positivos a *Neospora caninum* en los distritos de Matahuasi, Concepción, 9 de julio y Santa Rosa. 2010

Distritos Evaluados	Animales Muestreados	Total animales positivos	%
Matahuasi(6)*	80	55	68.7
Concepción (3)*	40	10	25.0
9 de Julio (3)*	34	15	22.6
Santa Rosa (3)*	28	5	17.8
TOTAL	182	85	46.7

* Número de establos muestreados por distrito

Cuadro 11. Frecuencia relativa porcentual de bovinos positivos a *Neospora caninum* según tipo de crianza en los distritos de Matahuasi, Concepción, 9 de julio y Santa Rosa. 2010

Distritos Evaluados	Tipo de Crianza								
	Intensivo			Extensivo			Semi Intensivo		
	n	Animales positivos	%	n	Animales positivos	%	n	Animales positivos	%
Matahuasi	44	28	63.6	20	16	80.0	16	11	68.7
Concepción	21	6	28.6	8	1	12.5	11	3	27.3
9 de Julio	-	-	-	6	3	50.0	28	12	42.8
Santa Rosa	12	-	-	16	5	31.2	-	-	-
TOTAL	77	34	44.1	50	25	50.0	55	26	47.3

V. DISCUSION

Los resultados obtenidos en el presente estudio (46.7%), mediante la técnica de Elisa indirecto, resultan altos si se compara con lo hallado por Puray en el 2005 en Junín (12.8%); probablemente debido al hecho de la introducción de nuevos vientres, sin descartar en ellos la presencia de enfermedades como *N. caninum*, lo cual sería una práctica frecuente con el objetivo de mejorar su ganadería lechera. Esto ha propiciado el incremento en la seroprevalencia de la neosporosis en las cuencas lecheras de Arequipa 57% (Andresen, 1999) y Cajamarca 45.9% (Rodriguez, 2009).

Puray en el 2005 realizó su estudio en bovinos de la SAIS Pachacutec, caracterizada por ser un sistema de crianza extensiva donde sus animales se encuentran separados por especies (bovinos, ovinos, alpacas y llamas), cada una delimitada por barreras naturales o artificiales sin realizar una crianza mixta, presentando vías de comunicación rudimentarias, lo que hace difícil el comercio, tráfico, traslado de animales y la compra clandestina de ganado infectado, como sucedió en Amazonas donde la prevalencia hallada a *N. caninum* fue de 40.4% atribuido a estos factores (Quevedo *et al.*, 2003). En este estudio, los establos están ubicados a la margen izquierda del río Mantaro, contando con una carretera asfaltada, de libre tránsito, facilitando el movimiento de animales pese a que muchos ganaderos no admitieron esta posibilidad.

Dentro de los aspectos que podrían haber intervenido en la difusión de *Neospora caninum* en el Valle del Mantaro y sobre todo que hayan contribuido al incremento de la frecuencia en el distrito de Matahuasi (68.7%), serían: permanencia de las vacas seropositivas (manteniéndose la transmisión vertical) dentro del hato, presencia de caninos que conviven con los bovinos dentro de los establos y falta de medidas higiénicas sanitarias en las explotaciones lecheras, entre otros.

A pesar que la transmisión vertical o congénita de *N. caninum*, constituye la principal vía de transmisión (Bjorkman *et al.*, 1996) e incluso se demostró a través del estudio de sangre precalostrar de vacas infectadas por *N. caninum*, que el 81 al 95% de ellas transmiten la infección a sus crías (Paré *et al.*, 1997; Wouda *et al.*, 1998), la mayoría de los establos muestreados mantienen a las vacas que abortan, sin llegar incluso a determinar sus causas; debido principalmente a la falta de información y/o conocimiento de las enfermedades que las originan; & por ello la importancia de difundir toda información sobre las formas de infección de este protozoo. Estudios en vacas seropositivas y con historia de aborto en EE.UU, Inglaterra y Brasil mostraron 2.0, 3.5 y 3.3% más probabilidad de aborto que en seronegativas (Paré *et al.*, 1997; Davison *et al.*, 1999). Para Pereira – Bueno *et al.*, en el 2000 el porcentaje de hijas de madres seropositivas a *N. caninum* es del 50%, evidenciando un predominio de la transmisión vertical en bovinos.

Por otro lado, en el estudio se ha observado la presencia de perros, tanto en los establos muestreados como en sus alrededores, es decir con acceso libre a las instalaciones; caminando y defecando libremente sobre el alimento o dentro de los corrales, por lo que existen las condiciones propicias para que se realice la transmisión horizontal del perro al ganado o visceversa. Así, Cornejo (2004) encontró una seroprevalencia de *N. caninum* del 19.3% en perros de establos lecheros de las provincias de Huancayo, Jauja y Concepción; debido posiblemente al contacto permanente del perro con el ganado los cuales son utilizados como pastores para el cuidado del ganado, durante el día y noche.

El perro y el coyote, son considerados hospederos definitivos del *N. caninum*, de gran importancia en la transmisión horizontal de la infección. Por esto se dice que existe

asociación entre la presentación de *N. caninum* en hatos con problemas de aborto y la presencia del perro y cánidos silvestres. Estudios señalan que el porcentaje de hijas de madres seronegativas es de un 7% para neospora. (Pereira – Bueno *et al.*, 2000). Se dice también que el perro puede eliminar más de 500,000 ooquistes después de alimentarse con tejido infectado (Mc Allister *et al.*, 1998; Barling *et al.*, 2000; Gondim *et al.*, 2004a).

La convivencia de los perros y los bovinos dentro del establo incrementan el riesgo de transmisión de neosporosis (Basso, *et al.*, 2001b). Así existe una actividad muy común realizada en los establos del estudio, consistente en permitir que los perros se alimenten de los restos placentarios producto de un aborto o un parto reciente; contrariamente y de forma minoritaria, existen otros establecimientos que desechan los fetos abortados y restos placentarios adecuadamente, procediendo a su entierro o incineración.

En la mayoría de los establos muestreados, no se realizan medidas de control sanitario de esta enfermedad, como serían las evaluaciones serológicas periódicas del ganado, para determinar y eliminar las vacas seropositivas manteniéndose la costumbre de adquirir los animales de reemplazo en ferias sin la evaluación previa. Este tipo de actividad constituye la principal causa para el ingreso del *N. caninum* al establo ganadero. En el caso de adquirir un semental infectado, su transmisión no sería tan riesgosa ya que a pesar de haber sido demostrado que este protozoo puede ser eliminado a través del semen de toros y su ADN ocasionalmente detectado en muestras de semen congelado, estudios recientes señalaron como poco probable la ocurrencia de transmisión venérea; dados que las cantidades de *N. caninum* serían insuficientes para producir la infección (Moore *et al.*, 2005).

En el estudio se pudo determinar que de los 15 hatos muestreados, son escasos los que llevan algún tipo de registro de sus animales; así; dos de ellos mostraron fichas clínicas (13.3 %); tres cuentan con cuaderno (20%) y diez llevan la información en la memoria (66.7%), evidenciándose que esta es la forma frecuente con la que son manejados sus animales entre los pequeños ganaderos.

En el Perú aún faltan más estudios que permitan evidenciar los factores no infecciosos e infecciosos que intervienen en las pérdidas embrionarias y fetales; sin embargo, estudios recientes indican que algunos agentes infecciosos como la *Diarrea Viral Bovina* (DVB) y la *Neospora caninum* son los agentes de mayor relevancia en la presentación del aborto en el ganado lechero de nuestro país (Rivera, 2001).

En general, los bovinos lecheros del Valle del Mantaro presentaron anticuerpos contra *N. caninum* en un alto porcentaje (46.7%); mientras que; los perros de establos y alrededores tienen acceso libre a los comederos y corrales de los bovinos, incrementando las posibilidades de transmisión horizontal del perro al ganado o visceversa de una manera constante.

En el campo es difícil establecer cuando ha ocurrido una pérdida embrionaria o un aborto; por ello se determina pérdida o muerte embrionaria cuando al momento de confirmar la gestación (83-89 días), la vaca o vaquilla se encuentra vacía (habiendo resultado gestante al diagnóstico entre los días 43 y 49 post servicio). En nuestro medio se ha fijado una tasa mensual de abortos en vacas en 1.0% y vaquillonas en 0.5%. (Perulactea, 2011). Es por ello que no se observó aborto durante el tiempo que demandó la toma de muestras (dos meses). La presencia de anticuerpos demuestra infección y no así enfermedad (Dubey, 2003).

La infección en los vacunos lecheros es difícil de erradicar una vez ingresado al hato; la falta de conocimiento del ganadero sobre este parásito hace que no se tomen las medidas de control adecuadas y necesarias para eviten su incremento y difusión.

Una manera sería propiciar para divulgar la importancia de esta enfermedad, así como discutir sobre las medidas de control, la implementación de forma regular de días de campo con los ganaderos de la zona, es decir, organizar charlas informativas sobre los problemas reproductivos que ocasiona este protozoo, su transmisión, medidas sanitarias, etc; con representantes del Senasa, médicos veterinarios, los gobiernos locales y regionales.

V. CONCLUSIONES

- ✍ La infección por *Neospora caninum* está presente en las vacas lecheras de la provincia de Concepción, en la cuenca izquierda del río Mantaro en el Valle del Mantaro (Junín); con una frecuencia de 46.7% .
- ✍ De los cuatro distritos evaluados, Matahuasi presentó una mayor frecuencia de *N. caninum* con 68.7%.

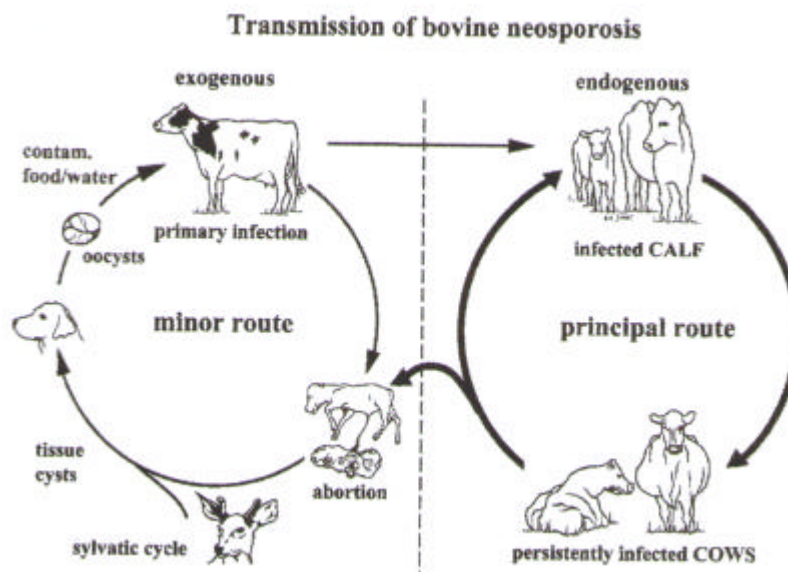
.

VI. RECOMENDACIONES

- ✍ Realizar charlas informativas y educativas sobre la enfermedad a los ganaderos de la zona; orientándolos sobre las medidas de prevención y control de la neosporosis.
- ✍ Delimitar los espacios de los perros en los establos y ver alternativas de control (esterilización).
- ✍ Evitar quedarse con las vacas seropositivas, ir reemplazandolas para impedir la transmisión vertical.
- ✍ Implementar un sistema de registros adecuado en cada establo para conocer los problemas reproductivos y sanitarios de cada animal.

VII. ANEXOS

Anexo 1. Figura 1. Esquema Transmisión Bovina de la Neosporosis.



Anexo 2. Mapa Provincia de Concepción – Junín.



Anexo 2. Mapa Distritos Muestreados: Matahuasi, Concepción, 9 de Julio y Santa Rosa



Anexo 3. Valores de Densidad Óptica y Valores Porcentuales Positivos de la Prueba de Elisa en dilución 1:100.

Muestra	Cociente (S/P)	Valor OD	Muestra	Cociente(S/P)	Valor OD
01	0,006	0,059	31	0,146	0,245
02	0,091	0,077	32	1,672	1,342
03	0,311	0,13	33	0,048	0,184
04	0,212	0,132	34	0,255	0,207
05	0,350	0,182	35	0,240	0,203
06	0,073	0,099	36	0,565	0,292
07	0,036	0,075	37	0,295	0,218
08	0,058	0,093	38	2,947	0,946
09	0,001	0,074	39	0,638	0,312
10	0,110	0,102	40	0,306	0,221
11	0,198	0,144	41	0,129	0,12
12	0,042	0,069	42	0,073	0,135
13	0,076	0,077	43	1,789	0,769
14	0,245	0,14	44	0,200	0,123
15	0,123	0,1	45	0,401	0,198
16	0,594	0,196	46	2,035	0,86
17	0,057	0,094	47	1,056	0,567
18	1,031	0,304	48	2,454	1,152
19	0,210	0,127	49	1,068	0,572
20	0,163	0,126	50	1,789	0,769
21	1,586	0,647	51	2,519	1,179
22	1,976	0,769	52	0,448	0,260
23	0,904	0,382	53	3,254	1,487
24	0,020	0,164	54	2,712	1,054
25	1,453	0,58	55	1,335	1,013
26	0,263	0,235	56	0,112	0,137
27	1,952	0,733	57	1,427	1,563
28	2,826	1,396	58	1,108	0,85
29	-0,024	0,133	59	0,581	0,473
30	0,058	0,191	60	0,097	0,126

Muestra	Cociente(S/P)	Valor OD	Muestra	Cociente(S/P)	Valor OD
61	0,007	0,065	101	0,347	0,176
62	1,881	0,803	102	2,319	1,162
63	0,087	0,105	103	0,211	0,125
64	1,484	1,623	104	1,026	1,139
65	0,097	0,144	105	0,745	0,618
66	-0,012	0,069	106	1,110	0,518
67	1,854	2,014	107	2,599	1,889
68	0,149	0,104	108	1,096	0,83
69	1,799	0,878	109	1,590	0,812
70	3,223	1,474	110	1,990	1,004
71	0,170	0,196	111	3,632	1,45
72	3,796	1,179	112	0,146	0,186
73	2,200	0,741	113	0,063	0,102
74	1,177	0,9	114	2,401	1,13
75	1,446	1,34	115	1,250	1,376
76	1,278	0,958	116	0,095	0,125
77	0,048	0,091	117	0,093	0,123
78	1,409	1,066	118	0,091	0,122
79	1,732	1,885	119	4,112	1,048
80	1,791	1,32	120	0,240	0,113
81	0,023	0,08	121	0,006	0,154
82	2,187	1,997	122	0,080	0,159
83	0,132	0,151	123	0,372	0,239
84	1,475	1,113	124	0,186	0,188
85	0,131	0,121	125	0,255	0,207
86	1,648	1,219	126	0,200	0,192
87	0,079	0,114	127	0,372	0,239
88	1,512	1,653	128	0,299	0,219
89	1,482	1,102	129	0,470	0,266
90	0,160	0,126	130	3,672	1,145
91	1,365	1,034	131	3,377	1,064
92	1,055	1,17	132	1,462	1,354
93	2,256	1,647	133	1,976	0,769
94	1,140	1,26	134	1,737	0,75
95	0,114	0,079	135	0,023	0,067
96	0,151	0,132	136	2,859	1,107
97	-0,010	0,07	137	1,590	0,812
98	0,024	0,081	138	0,790	0,4
99	2,256	1,647	139	1,990	1,004
100	1,140	1,26	140	0,352	0,238

Muestra	Cociente(S/P)	Valor OD	Muestra	Cociente(S/P)	Valor OD
141	0,163	0,107	181	2,498	1,031
142	3,212	1,295	182	0,279	0,211
143	2,321	1,163			
144	3,454	1,707			
145	0,123	0,138			
146	0,127	0,141			
147	1,169	0,884			
148	1,396	1,046			
149	0,950	0,728			
150	1,086	0,435			
151	3,599	1,125			
152	0,179	0,186			
153	0,262	0,209			
154	3,483	1,093			
155	0,230	0,2			
156	3,449	1,25			
157	0,334	0,176			
158	0,137	0,106			
159	4,074	1,466			
160	0,265	0,119			
161	1,689	0,642			
162	0,178	0,144			
163	0,037	0,062			
164	0,176	0,119			
165	-0,051	0,055			
166	0,024	0,064			
167	0,084	0,086			
168	0,021	0,063			
169	0,129	0,12			
170	0,046	0,064			
171	0,095	0,108			
172	0,115	0,097			
173	1,718	0,47			
174	0,214	0,151			
175	4,986	1,781			
176	1,747	0,662			
177	0,037	0,08			
178	0,169	0,117			
179	2,864	1,048			
180	0,073	0,135			

VIII. BIBLIOGRAFIA

Anderson M, Blanchard P, Barr B, Dubey JP, Hoffman R, Conrad P. 1991. Neospora-like protozoan infection as a major cause of abortion in California dairy cattle. J Am Vet Med Assoc 198:241-244.

Anderson ML, Reynolds JP, Rowe JD, Sverlow KW, Packham AE, Barr BC, Conrad PA. 1997. Evidence of vertical transmission of *Neospora* sp infection in dairy cattle. J Am Vet Med Assoc 210: 1169-1172.

Anderson ML, Andrianarivo AG, Conrad PA. 2000. Neosporosis in cattle. Anim Reprod Sci 60/61: 417-431.

Andresen. H. 1999. Neosporosis en el Perú y el Mundo. Rev Cien Vet Perú 15 (4): 11-16.

Atkinson R, Cook R, Reddacliff L, Rothwell J, Broady K, Harper P, Ellis J. 2000. Seroprevalence of *Neospora caninum* infection following an abortion outbreak in a dairy cattle herd. Aust Vet J 78: 262-266.

Atocsa J, Chávez A, Casas E, Falcón N. 2005. Seroprevalencia de *Neospora caninum* en bovinos lecheros criados al pastoreo en la provincia de Melgar, Puno. Rev Inv Vet Perú 16(1): 71-75.

Barber J, Payne-Johnson C, Trees A. 1996. Distribution of *Neospora caninum* within the central nervous system and other tissues of six dogs with clinical neosporosis. Journal of Small Animal Practice. 37: 568-574.

- Barber J, Gasser R, Ellis J, Reichel M, McMillan D, Trees A. 1997.** Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* in different canid populations. J Parasitol 83: 1056-1058.
- Barber J, Trees A. 1998.** Naturally occurring vertical transmission of *Neospora caninum* in dog. Int J. Parasitol 28: 57-64.
- Barling KS, Sherman M, Peterson MJ, Thompson JA, McNeill JW, Craig TM, Adams LG. 2000.** Spatial association among density of cattle, abundance of wild canids, and seroprevalence to *Neospora caninum* in a population of beef calves. J Am Vet Med Assoc 217(9): 1361-1365.
- Barr BC, Anderson ML, Dubey JP, Conrad PA. 1991 a.** Neospora-like protozoal infections associated with bovine abortions. Vet Pathol 28: 110-116.
- Barr BC, Conrad PA, Dubey JP, Anderson ML. 1991b.** Neospora-like encephalomyelitis in a calf: pathology, ultrastructure and immunoreactivity. J Vet Diagn Invest 3: 39-46.
- Barr B, Conrad P, Breitmeyer R, Sverlow K, Anderson M, Reynolds J, Chauvet A, Dubey JP, Ardans A. 1993.** Congenital Neospora infection in calves born from cows that had previously aborted Neospora-infected fetuses: Four cases (1990-1992). J Am Vet Med Assoc 202: 113-117.
- Barr B, Rowe J, Sverlow K, BonDurant R, Ardans A, Oliver M, Conrad P. 1994.** Experimental reproduction of bovine fetal Neospora infection and death with a bovine Neospora isolate. J Vet Diagn Invest 6: 207-215.
- Barr BC, Anderson ML, Sverlow KW, Conrad PA. 1995.** Diagnosis of bovine fetal Neospora infection with an indirect fluorescent antibody test. Vet Rec 137: 611-613.
- Barr B, Bjerkas I, Buxton D, Conrad P, Dubey J, Ellis J, Jenkis M, Johnston S, Lindsay D, Sibley D, Trees A, Wouda W. 1997.** Neosporosis. Report of the international *Neospora* workshop. Parasitology 19: 120 – 126.

Basso W, Venturini L, Venturini M, Hill D, Kwok O, Shen S, Dubey JP. 2001a. First isolation of *Neospora caninum* from the feces of a naturally infected dog. J Parasitol 87:612-618.

Basso W, Venturini L, Venturini M, Moore P, Rambeau M, Unzaga J, Campero C, Bacigalupe D, Dubey JP. 2001b. Prevalence of *Neospora caninum* infection in dogs from beef-cattle farms, dairy farms, and from urban areas of Argentina. J Parasitol 87: 906-907.

Basso W, Venturini M, Bacigalupe D, Kienast M, Unzaga J, Larsen A, Machuca M, Venturini L. 2005. Confirmed clinical *Neospora caninum* infection in a Boxer puppy from Argentina. Vet Parasitol 131: 299 – 303.

Bayer. 1999. Diseases related to protozoo and possibilities for treatment. En: Bayer workshop at the 17th internacional Conference of the W.A.A.V.P.

Baszler TV, Knowles DP, Dubey JP, Gay JM, Mathison BA, McElwain TF. 1996. Serological diagnosis of bovine neosporosis by *Neospora caninum* monoclonal antibody-based competitive inhibition enzyme-linked immunosorbent assay. J Clin Microbiol 34: 1423-1428.

Bjerkas I, Mohn SF, Presthus J. 1984. Unidentified cyst-forming-sporozoon causing encephalomyelitis and myositis in dogs. Z Parasitenkd 70: 271-274.

Bjerkas I, Jenkins MC, Dubey JP. 1994. Identification and characterization of *Neospora caninum* tachyzoite antigens useful for diagnosis of neosporosis. Clin Diagn Lab Immunol 1: 214-221.

Björkman C, Johansson O, Stenlund S, Holmdahl OJM, Uggla, A. 1996. *Neospora* species infection in a herd of dairy cattle. J Am Vet Med Assoc 208: 1441-1444.

Björkman C, Uggla A. 1999. Serological diagnosis of *Neospora caninum* infection. Int J Parasitol 29: 1497-1507.

Björkman C, Naslund K, Stenlund S, Maley SW, Buxton D, Uggia A. 1999. An IgG avidity ELISA to discriminate between recent and chronic *Neospora caninum* infection. J Vet Diagn Invest 11:41 -44.

Björkman C, Alenius S, Emanuelsson U, Uggla A. 2000. *Neospora caninum* and bovine virus diarrhea virus infections in Swedish dairy cows in relation to abortion. Vet J 159:201-206.

Boulton JC, Gill PA, Cook RW, Fraser GC, Harper PAW, Dubey JP. 1995. Bovine *Neospora* abortion in north-eastern New South Wales. Aust Vet J 72: 119-120.

Buxton D, Maley S, Thomson K, Trees AM, Innes E. 1997a. Experimental Infection of Non-pregnant and Pregnant Sheep with *Neospora caninum*. J Comp Path 117: 1-16.

Buxton D, Maley S, Pastoret P, Brochier B, Innes E. 1997b. Examination of red foxes (*Vulpes vulpes*) from Belgium for antibody to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. Vet Record 141: 308-309.

Cabrera M, Ortiz P, Claxton J, Williams D, Trees A. 2000. Evidencia serológica de infección por *Neospora caninum* en Ganado vacuno en Perú. En: IV Congreso Peruano de Parasitología. Lima p.212.

Casas G. 2005. Seroprevalencia de *Neospora caninum* en Llamas de la SAIS Pachacutec – Junín. Tesis de Médico Veterinario. Lima: Uni. Nac. Mayor de San Marcos. 50 p.

CENAGRO-INEI. 1994. III Censo Nacional Agropecuario. Disponible en: <http://www.inei.gob.pe/BancoCuadros/bancua06a.asp?PARAMETRO=03120100> Departamento: Provincia: HUANCAYO

Chávez A, Serrano E, Casas E, Ortega L. 2002. *Neospora caninum* en camélidos sudamericanos peruanos. Rev Inv Vet Perú 13: 92-93.

Chávez A, Álvarez G, Collantes E, Casas E, Rosadio R, Serrano E, Ortega L. 2004. First report of *Neospora caninum* infection in adult alpacas (*Vicugna pacos*) and llamas (*Lama glama*). J Parasitol 90(4):864-866.

Cole R, Lindsay D, Blagburn B, Sorjonen D, Dubey J. 1995. Vertical transmission of *Neospora caninum* in dogs. J Parasitol 8: 208-211.

Cornejo N, Chávez A, Casas E, Arana C. 2004. Seroprevalencia de *N. caninum* en perros de establos lecheros de la cuenca izquierda del valle del Mantaro. Rev Inv Vet Perú 15(1): 70-75.

Daniel W. 1996. Bioestadística: base para el análisis de la ciencia de la salud. 5ta edición. México: Limusa. 205-207 p.

Davison HC, Otter A, Trees AJ. 1999. Significance of *Neospora caninum* in British dairy cattle determined by estimation of seroprevalence in normally calving cattle and aborting cattle. Int J Parasitol 29: 1189 – 1194.

Del Campo J, Chávez A, Delgado A, Falcón N, Ornelas Á, Casas E, Serrano E. 2003. Frecuencia de *Neospora caninum* en perros de establos lecheros del Valle de Lima. Rev Inv Vet Perú 14: 145-149.

Dijkstra T, Barkema HW, Hesselink JW, Wouda W. 2002. Point source exposure of cattle to *Neospora caninum* consistent with periods of common housing and feeding and related to the introduction of a dog. Vet Parasitol 105: 89-98.

Dijkstra Th, Barkema HW, Eysker M, Beiboer ML, Wouda W. 2003. Evaluation of a single serological screening of dairy herds for *Neospora caninum* antibodies. Vet Parasitol 110: 161-169.

Dubey JP, Carpenter J, Speer C, Topper M, Uggla A. 1988a. Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. J Am Vet Med Assoc 192: 1269-1285.

Dubey JP, Hattel AL, Lindsay DS, Topper MJ. 1988b. Neonatal *Neospora caninum* infection in dogs: Isolation of the causative agent and experimental transmission. J Am Vet Med Assoc 193: 1259-1263.

Dubey JP, Leathers CW, Lindsay DS. 1989. *Neospora caninum*-like protozoon associated with fatal myelitis in newborn calves. J Parasitol 75: 146-148.

Dubey JP, Lindsay DS. 1990. *Neospora caninum* induced abortion in sheep. J Vet Diagn Invest 2: 230-233.

- Dubey JP, Porterfield M. 1990.** *Neospora caninum* (Apicomplexa) in an aborted equine fetus. J Parasitol 76: 732-734.
- Dubey JP, Hartley WJ, Lindsay DS, Topper MJ. 1990a.** Fatal congenital *Neospora caninum* infection in a lamb. J Parasitol 76: 127-130.
- Dubey JP, Hartley WJ, Lindsay DS. 1990b.** Congenital *Neospora caninum* infection in a calf with spinal cord anomaly. J Am Vet Med Ass 197: 1043-1044.
- Dubey JP, Acland HM, Hamir AN. 1992a.** *Neospora caninum* (Apicomplexa) in a stillborn goat. J Parasitol 78: 532-534.
- Dubey JP, Lindsay DS, Anderson ML, Davis SW, Shen SK. 1992b.** Induced transplacental transmission of *Neospora caninum* in cattle. J Am Vet Med Assoc 201: 709-713.
- Dubey JP, de Lahunta A. 1993.** Neosporosis associated congenital limb deformities in a calf. Appl Parasitol 34: 229-233.
- Dubey JP, Lindsay DS. 1996.** A review of *Neospora caninum* and neosporosis. Vet Parasitol 67: 1-59.
- Dubey JP, Morales JA, Villalobos P, Lindsay DS, Blagburn BL, Topper MJ. 1996.** Neosporosis-associated abortion in a dairy goat. J Am Vet Med Assoc. 208: 263-265.
- Dubey JP, Jenkins MC, Adams DS, McAllister MM, Anderson-Sprecher R, Baszler TV, Kwok OCH, Lally NC, Bjorkman C, Uggla A. 1997.** Antibody responses of cows during an outbreak of neosporosis evaluated by indirect fluorescent antibody test and different enzyme-linked immunosorbent assays. J Parasitol 83: 1063-1069.
- Dubey JP. 1999a.** Neosporosis in cattle: biology and economic impact. J Am Vet Med Assoc 214: 116-163.
- Dubey JP. 1999b.** Recent advances in *Neospora* and neosporosis. Vet Parasitol 84: 349-367.

- Dubey JP, Hollis K, Romand S, Thulliez P, Kwok OCH, Hungerford L, Anchor C, Etter D. 1999.** High prevalence of antibodies to *Neospora caninum* in white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*). *Int J Parasitol* 29: 1709-1711.
- Dubey JP, Bjerkas T, Bjorkman C, Blagburn BL, Bowman DD, Buxton D, Ellis JT, Gottstein B, Hemphill A, Hill DE, Howc DK, Jenkins MC, Kobayashi Y, Koudela B, Marsh AE, Mattsson JG, McAllister MM, Modry D, Omata Y, Sibley LD, Speer CA, Trees AJ, Uggla A, Upton SJ, Williams DJL, Lindsay DS. 2002.** Redescription of *Neospora caninum* and its differentiation from related coccidia. *Int J Parasitol* 32: 929-946.
- Dubey JP. 2003a.** Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals. *Korean J Parasitol* 41(1): 1-16.
- Dubey JP, Zamke R, Thomas NJ, Wong SK, Van Bonn W, Briggs M, Davis JW, Ewing R, Mense M, Kwok OCH, Romand S, Thulliez P. 2003b.** *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum*, *Sarcocystis neurona*, and *Sarcocystis canis*-like infections in marine mammals. *Vet Parasitol* 116: 275-296.
- Dubey JP, Sreekumar C, Knickman E, Miska KB, Vianna MCB, Kwok OCH, Hill DE, Jenkins MC, Lindsay DS, Greene CE. 2004.** Biologic, morphologic and molecular characterisation of *Neospora caninum* isolates from littermate dogs. *Int J Parasitol* 34: 1157-1167.
- Dubey JP, Schares G. 2006.** Diagnosis of bovine neosporosis. *Vet Parasitol* 140(1-2): 1-34.
- Dubey JP, Buxton D, Wouda W. 2006.** Pathogenesis of bovine neosporosis. *J Comp Pathol* 134:267-289.
- Dubey JP, Schares G, Ortega-Mora LM. 2007.** Epidemiology and control of neosporosis and *Neospora caninum*. *Clin Microbiol Rev* 20(2): 323-367.
- Ellis J, Luton K, Boverstock PR, Brindley PJ, Nimmoka KA, Johnson AM. 1994.** The Phylogeny of *Neospora caninum*. *Mol Biochem Parasitol* 64: 303-311.

- Ferre I, Aduriz G, del Pozo I, Regidor-Cerrillo J, Atxaerandio R, Collantes-Fernández E, Hurtado A, Ugarte-Garagalza C, Ortega-Mora LM. 2005.** Detection of *Neospora caninum* in the semen and blood of naturally infected bulls. *Theriogenology* 63: 1504-1518.
- Gennari SM, Yai LEO, D'Auria SNR, Cardoso SMS, Kwok OCH, Jenkins MC, Dubey JP. 2002.** Occurrence of *Neospora caninum* antibodies in sera from dogs of the city of Sao Paulo, Brazil. *Vet Parasitol* 106: 177-179.
- Georgieva DA, Prelezov PN, Koinarsky V. 2006.** *Neospora caninum* and neosporosis a review. *Bulg J Vet Med* 9: 1-26.
- Gondim LFP, Gao L, McAllister MM. 2002.** Improved production of *Neospora caninum* oocysts, cyclical oral transmission between dogs and cattle, and in vitro isolation from oocysts. *J Parasitol* 88: 1159-1163.
- Gondim LFP, Mc Allister M, Pitt W, Zemlicka D. 2004a.** Coyotes (*Canis latrans*) are definitive hosts of *Neospora caninum*. *Int J Parasitol* 34: 159-161.
- Gondim LFP, Me Allister M, Mateus-Pinilla NE, Pitt WC, Mech LD, Nelson ME. 2004b.** Transmission of *Neospora caninum* between wild and domestic animals. *J Parasitol* 90(6): 1361-1365.
- Graham DA, Calvert V, Whyte M, Marks J. 1999.** Absence of serological evidence for human *Neospora caninum* infection. *Vet Rec* 144: 672-673.
- Hall CA, Reichel MP, Ellis JT. 2005.** Neospora abortions in dairy cattle: diagnosis, mode of transmission and control. *Vet Parasitol* 128: 231-241.
- Hemphill A, Gottstein B. 2006.** *Neospora caninum* and neosporosis - recent achievements in host and parasite cell biology and treatment. *Acta Parasitol* 51(1): 15-25.
- Holmdahl OJ, Mattsson JG, Uggla A, Johansson KE. 1994.** The Phylogeny of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* based on ribosomal RNA sequences. *FEMS Microbiol Lett* 119: 187-192.

IGP. Lima: Instituto Geofísico del Perú. [Internet], [14 noviembre 2011]. Disponible en: <http://www.igp.gob.pe>

Jara Villa J. 2010. Determinación de Anticuerpos contra *Neospora caninum* en Búfalos de Agua. Tesis de Médico Veterinario. Lima: Uni. Nac.Mayor de San Marcos. 42 p.

Liao M, Zhang S, Xuan X, Zhang G, Huang X, Igarashi I, Fujisaki K. 2005. Development of Rapid Immunochromatographic Test with Recombinant NcSAG1 for Detection of Antibodies to *Neospora caninum* in Cattle. Clin Diagn Lab Immunol 12(7): 885-887.

Lindsay D, Dubey J. 1989. Immunohistochemical diagnosis of *Neospora caninum* in tissue sections. Am J Vet Res 50: 1981-1983.

Lindsay D, Speer C, Toivio-Kinnucan M, Dubey J, Blagburn B. 1993. Use of infected cultured cells to compare ultrastructural features of *Neospora caninum* from dogs and *Toxoplasma gondii*. Am J Vet Res 54:103-106.

Lindsay D, Rippey N, Cole R, Parsons L, Dubey J, Tidwell R, Blagburn B, 1994. Examination of the activities of 43 chemotherapeutic agents against *Neospora caninum* tachyzoites in cultured cells. Am J Vet Res 55:976-981.

Lindsay DS, Rippey NS, Powe TA, Sartin EA, Dubey JP, Blagburn BL. 1995. Abortions, fetal death, and stillbirths in pregnant pygmy goats inoculated with tachyzoites of *Neospora caninum*. Am J Vet Res 56: 1176-1180.

Lindsay DS, Kelly JE, McKown R, Stein FJ, Herman J, Dubey JP, Blagburn BL. 1996a. Prevalence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* antibodies in coyotes (*Canis latrans*) and experimental infections of cpyotes with *Neospora caninum*, J Parasitol 82: 657-659.

Lindsay D, Upton S, Dubey J. 1999a. A structural study of the *Neospora caninum* oocyst. Int J Parasitol 29: 1521-1523.

Lindsay DS, Dubey JP, Duncan RB. 1999b. Confirmation that the dog is a definitive host for *Neospora caninum*. Vet Parasitol 82: 327-333.

- Lindsay DS, Dubey JP, McAllister MM. 1999c.** *Neospora caninum* and potential for parasite transmission. *Compendium* 21: 317-321.
- Lindsay DS, Weston JL, Little SE. 2001.** Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in gray foxes (*Urocyon cinereoargenteus*) from South Carolina. *Vet Parasitol* 97: 159-164.
- Marsh A, Barr B, Madigan J, Lakritz J, Nordhausen R, Conrad P. 1996.** Neosporosis as a cause of equine protozoal myeloencephalitis. *J Am Vet Med Assoc* 209: 1907-1916.
- McAllister MM, McGuire AM, Jolley WR, Lindsay DS, Trees AJ, Stobart RH. 1996.** Experimental neosporosis in pregnant ewes and their offspring. *Vet Parasitol* 33: 647-655.
- McAllister M, Dubey JP, Lindsay D, Jolley W, Wills R, McGuire A. 1998.** Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. *Int J Parasitol* 28: 1473-1478.
- McAllister MM, Bjorkman C, Anderson-Sprecher R, Rogers DG. 2000.** Evidence of point-source exposure to *Neospora caninum* and protective immunity in a herd of beef cows. *J Am Vet Med Assoc* 217: 881-887.
- McAllister M. 2005.** The comparative pathology of neosporosis. En: I Fórum Brasileiro de Estudos sobre *Neospora caninum*. Sao Paulo 14-16.
- McCann C, Vyse A, Salmon R, Thomas D, Williams D, McGarry John, Pebody R, Trees A. 2008.** Lack of Serologic Evidence of *Neospora caninum* in Humans, England. *Emerging Infectious Diseases* 14(6): 978-980.
- Mineo T, Silva D, Costa G, vonAncken A, Kasper L, Souza M, Cabral D, Costa A, Mineo J. 2001.** Detection of IgG antibodies to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in dogs examined in a veterinary hospital from Brazil. *Vet Parasitol* 98: 239-245.
- Moore DP, Odeón AC, Campero CM, 2001.** Neosporosis bovina: una actualización. *Vet Arg* 180(13): 752-775.

Moore D, Campero C, Odeón A, Posso M, Cano D, Leunda M, Basso W, Venturini M, Spath E. 2002. Seroepidemiology of beef and dairy herds and fetal study of *Neospora caninum* in Argentina. Vet Parasitol 107: 303-316.

Moore DP. 2005. Neosporosis in South America. Vet Parasitol 127: 87-97.

Moore DP, Odeón AC, Venturini MC, Campero CM. 2005. Neosporosis bovina: conceptos generales, inmunidad y perspectivas para la vacunación. Rev Argent Microbiol 37(4): 217-228.

Okeoma CM, Williamson NB, Pomroy WE, Stowell KM, Gillespie L. 2004a. Isolation and molecular characterization of *Neospora caninum* in cattle in New Zealand. NZ Vet J 52: 364-370.

Okeoma CM, Williamson NB, Pomroy WE, Stowell KM, Gillespie L. 2004b. The use of polymerase chain reaction to detect *Neospora caninum* deoxyribonucleic acid in the blood of naturally infected cows. Vet Parasitol 122: 307-315.

Ordeix L, Llonet A, Fondevila D, Dubey JP, Ferrer L, Fondati A. 2002. Cutaneous neosporosis during treatment of pemphigus foliaceus in a dog. J. Am Anim Hosp Assoc 38: 415 – 419.

Ortega L, Quintanilla A, Pereira J. 1997. Neosporosis ovina y caprina: conocimientos actuales. En: Tratado de Patología y Producción Ovina. Ortega L, ed. Madrid: Luzan. Cap 5.

Ortega LM, Collantes E, Álvarez G. 2001. La neosporosis del ganado bovino: una enfermedad emergente. Rev Cien Vet Lima 17: 7-14.

Ortega-Mora LM, Ferre I, del-Pozo I, Caetano-da-Silva A, Collantes-Fernández E, Regidor-Cerrillo J, Ugarte-Garagalza C, Aduriz G. 2003. Detection of *Neospora caninum* in semen of bulls. Vet Parasitol 28: 301-308.

Ortega-Mora LM, Fernández-García A, Gómez-Bautista M. 2006. Diagnosis of bovine neosporosis: Recent advances and perspectives. Acta Parasitol 51(1): 1-14.

- Otter A, Jeffrey M, Scholes SFE, Helmick B, Wilesmith JW, Trees AJ. 1997.** Comparison of histology with maternal and fetal serology for the diagnosis of abortion due to bovine neosporosis. *Vet Rec* 141: 487-489.
- Paré J, Hietala S, Thurmond M. 1995.** Interpretation of an indirect fluorescent antibody test for diagnosis of *Neospora* sp. infection in cattle. *J Vet Diagn Invest* 7: 273-275.
- Paré J, Thurmond MC, Hietala SK. 1996.** Congenital *Neospora caninum* infection in dairy cattle and associated calfhood mortality. *Can J Vet Res* 60: 133-139.
- Paré J, Thurmond MC, Hietala SK. 1997.** *Neospora caninum* antibodies in cows during pregnancy as a predictor of congenital infection and abortion. *J Parasitol* 83: 82-87.
- Paré J, Fecteau G, Fortin M, Marsolais G. 1998.** Seroepidemiologic study of *Neospora caninum* in dairy herds. *JAUMA*. 213: 1595-1598.
- Pereira-Bueno J, Quintanilla-Gozalo A, Seijas-Carballedo A, Costas E, Ortega-Mora L.M. 2000.** Observational studies in *Neospora caninum* infected dairy cattle: pattern of transmission and age-related antibody fluctuations. *J. Parasitol* 30: 906-909.
- Perulactea.** Lima: Blog Personal Hans Andresen. [Internet], [15 diciembre 2011]. Disponible en: <http://www.handresen.perulactea.com/2009/05/19/capitulo-8-problemas-reproductivos/>
- Petersen E, Lebech M, Jensen L, Lind P, Rask M, Bagger P, Bjorkman C, Uggl A. 1999.** *Neospora caninum* infection and repeated abortions in humans. *Emerg Infect Dis* 5: 278-280.
- Puray Chávez N. 2005.** Prevalencia de *Neospora caninum* en bovinos de una empresa ganadera de la Sierra Central del Perú. Tesis de Médico Veterinario. Lima: Uni. Nac. Mayor de San Marcos. 48 p.
- Quevedo J, Chávez A, Rivera H, Casas E, Serrano E. 2003.** Neosporosis en bovinos lecheros en dos distritos de la provincia de Chachapoyas. *Rev Inv Vet Perú* 14: 33-37.

Reichel MP, Thorton RN, Morgan PL, Mills RJM, Schares G. 1998. Neosporosis in a pup. *N Z Vet J* 46: 106-110.

Rivera H, Nelson D, Tabacchi L. 2000. *Neospora caninum* y otros agentes en fetos abortados de bovinos lecheros del valle de Lima. *Rev Inv Vet Perú* 11: 1-7.

Rivera Hermelinda. 2001. Causas frecuentes de aborto bovino. *Rev Inv Vet Perú* 12 (2): 117-122.

Rivera H, Benito A, Ramos O, Manchego A. 2004. Prevalencia de enfermedades de impacto reproductivo em bovinos de la estación experimental de trópico del centro de investigaciones IVITA. *Rev Inv Vet Perú* 15(2): 120-126.

Rodriguez Romero Gladys. 2009. Neosporosis en la Ganaderia Pecuaria en el Perú. Tesis de Médico Veterinario. Lima: Uni. Nac. Mayor de San Marcos. 83 p.

Rosadio R, Rivera H, Chávez A, Serrano E, Quispe R, Rodríguez J, Yaya C. 2003. Seroprevalencia de agentes abortigénicos en alpacas de Canchis-Cusco. En: III Congreso mundial de camélidos sudamericanos. Cusco: Perú. 11: 863-868.

Schares G, Conraths F, Reichel M. 1999. Bovine neosporosis: comparison of serological methods using outbreak sera from a dairy herd in New Zealand. *Int J Parasitol* 29: 1659-1667.

SENAMHI. Lima: Servicio Nacional de Meteorología e Hidrología del Perú. [Internet], [14 noviembre 2011]. Disponible en: <http://www.senamhi.gob.pe>

Serrano E. 2005. Identificación de *Neospora caninum* en abortos de camélidos sudamericanos domésticos del Perú. Tesis de Magíster. Lima: Facultad de Medicina Veterinaria, Univ. Nac. Mayor de San Marcos. 104 p.

Serrano-Martínez E, Collantes-Fernández E, Chávez-Velásquez A, Rodríguez-Bertos A, Casas-Astos E, Risco-Castillo V, Rosadio-Alcántara R, Ortega-Mora LM. 2007. Evaluation of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* infections in alpaca (*Vicugna pacos*) and llama (*Lama glama*) aborted fetuses from Perú. *Vet Parasitol* 150(1-2): 39-45.

- Silva P, Chávez A, Rivera H, Casas E. 2002.** Seroprevalencia de *Neospora caninum* en bovinos lecheros del Valle de Lima. Rev Inv Vet Perú 13:51-55.
- Slotved HC, Jensen L, Lind P. 1999.** Comparison of the IFAT and Iscom-ELISA response in bovine foetuses with *Neospora caninum* infection. Int J Parasitol 29: 1165-1174.
- Speer C, Dubey JF. 1989.** Ultrastructure of tachyzoites, bradyzoites and tissue. cysts of *Neospora caninum*. J Protozool 36: 458-63.
- Tarantino C, Rossi G, Kramer L, Perrucci S, Cringoli G, Macchioni G. 2001.** *Leishmania infantum* and *Neospora caninum* simultaneous skin infection in a young dog in Italy. Vet Parasitol 102: 77-83.
- Thurmond MC, Hielala SK. 1997.** Effect of *Neospora caninum* infection on milk production in first-lactation dairy cows. J Am Vet Med Assoc 210: 672.
- Tizard I. 2000.** Inmunología Veterinaria. 6ta ed. México: Mc Graw-Hill Interamericana. 517 p.
- Tranas J, Heinzen R, Weiss L, McAllister M. 1999.** Serological evidence of human infection with the Protozoan *Neospora caninum*. Clin Diagn Lab Immunol 6: 765-767.
- Trees AJ, Williams DJ. 2005.** Endogenous and exogenous transplacental infection in *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. Trends Parasitol 21: 558-561.
- Williams JH, Espie I, van Wilpe E, Matthee A. 2002.** Neosporosis in a white rhinoceros (*Ceratotherium simum*) calf. Tydskr S Afr Vet Ver 73: 38-43.
- Wouda W, Dubey JP, Jenkins MC. 1997a.** Serological diagnosis of bovine fetal neosporosis. J Parasitol 83: 547-550.
- Wouda W, Moen AR, Visser IJR, van Knapen F. 1997b.** Bovine fetal neosporosis: a comparison of epizootic and sporadic abortion cases and different age classes with regard to lesión severity and immunohistochemical identification of organisms in brain, heart and liver. J Vet Diagn Invest 9: 180-185.

Wouda W, Moen AR, Schukken YH. 1998. Abortion risk in progeny of cows after a *Neospora caninum* epidemic. Theriogenology 49: 1311-1316.

Wouda W, Dijkstra T, Kramer A, van Maanen C, Brinkhof J. 1999. Seroepidemiological evidence for a relationship between *Neospora caninum* infections in dogs and cattle. Int J Parasitol 29: 1677-1682.